

# **Alpha-Dispersion sowie Adsorption und Depletion neutraler und geladener Makromoleküle - Untersuchungen an Blutzellen**



D i s s e r t a t i o n  
zur Erlangung des akademischen Grades  
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Biophysik  
eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von  
Diplom Physiker Björn Neu  
(geb. am 09.06.1969 in Eutin)

Präsident der Humboldt Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. J.P. Rabe

Gutachter:     1. Prof. Dr. G. Fuhr  
                  2. PD Dr. E. Donath  
                  3. Prof. Dr. U. Zimmermann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.1999

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>5</b>
<b>1 Einführung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Elektrorotation und Alpha-Dispersion .....	7
1.2 Adsorption und Depletion von Polymeren an Partikeloberflächen.....	10
1.2.1 Polymerdepletion .....	11
1.2.2 Mehrschichtadsorption von Polymeren.....	13
<b>2 Experimentelle Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1 Meßmethoden.....	17
2.1.1 Elektrorotation.....	17
2.1.2 Elektrophorese.....	18
2.1.3 Durchflußzytometer .....	19
2.1.4 Mikroskopische Verfahren.....	19
2.2 Proben und Messlösungen.....	21
2.2.1 Messlösungen .....	21
2.2.2 Erythrozyten .....	22
2.2.3 Thrombozyten .....	23
2.2.4 Polymeradsorption & Hüllenpräparation .....	23
<b>3 Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>25</b>
3.1 Elektrorotation.....	25
3.1.1 Drehmoment von einschaligen Objekten.....	26
3.1.2 Das kubisch strukturierte Modell .....	28
3.1.3 Alpha – Dispersion.....	31
3.2 Elektrophorese.....	38
<b>4 Elektrorotation im Niederfrequenzbereich .....</b>	<b>43</b>
4.1 Fixierte Erythrozyten .....	43
4.2 Fixierte Thrombozyten.....	56

---

4.3 Zusammenfassung und Schlußfolgerung.....	63
<b>5 Erfassung von Polymer-Depletionschichten im Alpha-Dispersionsbereich....</b>	<b>65</b>
5.1 Depletion in Dextranlösungen .....	65
5.2 Elektrorotation in Dextranlösungen.....	69
5.3 Zusammenfassung und Schlußfolgerung.....	75
<b>6 Polyelektrolytdepletion und -adsorption bei Erythrozyten.....</b>	<b>77</b>
6.1 Depletion und Adsorption von PSS an nativen Erythrozyten .....	77
6.2 Erythrozyten als Template zur Herstellung von Polyelektrolytkapseln .....	84
6.3 Aussichten und Zusammenfassung .....	92
<b>Literatur .....</b>	<b>97</b>
<b>Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>109</b>

## **Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung dielektrischer Eigenschaften von Blutzellen und deren Wechselwirkung mit Polymeren.

Im ersten Teil wurde die Elektrorotation von Glutaraldehyd-fixierten Erythrozyten im Frequenzbereich von 16 Hz bis 33 MHz untersucht. Die Rotationsspektren wurden bei unterschiedlichen äußeren Leitfähigkeit (1,0 mS/m bis 18,5 mS/m) aufgenommen. Zwischen 16 Hz und 1 kHz zeigten die fixierten Erythrozyten eine Rotation parallel zur Feldrichtung mit einer maximalen Rotationsgeschwindigkeit zwischen 30 Hz und 70 Hz. Die Position war nahezu unabhängig von der Ionenstärke. Bei 3,5 mS/m erreicht die Rotationsgeschwindigkeit ein Maximum. In einem weiteren Schritt erfolgte die Aufnahme der Elektrorotationsspektren in Abhängigkeit von der Oberflächenladung. Dazu wurden die Erythrozyten vor der Fixierung mit Neuraminidase behandelt. Die Reduktion der Oberflächenladung ging mit einer deutlichen Reduktion der Rotationsgeschwindigkeit einher, wobei die Frequenz maximaler Rotation unbeeinflusst blieb. Diese experimentellen Resultate sind konsistent mit einer erst kürzlich entwickelten Theorie [58] und zeigen, daß die Elektrorotation im niederfrequenten Bereich durch die Oberflächenladung und –leitfähigkeit bestimmt werden.

Von Formaldehyd-fixierten Thrombozyten wurden Elektrorotationsspektren im Frequenzbereich von 16 Hz bis 33 Hz bei äußeren Leitfähigkeiten zwischen 0,7 mS/m und 16 mS/m aufgenommen. Ab einer externen Leitfähigkeit von 3,1 mS/m und unterhalb von 1 kHz konnte ebenfalls eine deutliche Rotation in Feldrichtung beobachtet werden. Zur Interpretation der Daten wurde ein theoretisches Modell weiterentwickelt, welches die innere vesikuläre Struktur der Thrombozyten berücksichtigt, und mit dem niederfrequenten Modell zur Elektrorotation superponiert. Es konnte gezeigt werden, daß die Daten mit diesem Modell konsistent sind.

In Lösungen von Dextran unterschiedlicher Molekulargewichte und Konzentrationen wurde sowohl die elektrophoretische Mobilität als auch Elektrorotation von fixierten Erythrozyten untersucht. Anhand der Mobilitäten konnten Dextran-Depletionschichtdicken zwischen 4,4 nm in Dextran mit 71 kDa und 18,2 nm mit 2400 kDa bestimmt

werden. Die Elektrorotationsspektren zeigten im niederfrequenten Bereich in den Lösungen mit höhermolekularem Dextran (464 kDa und 2400 kDa) eine relativ zur Viskosität zu hohe Rotationsgeschwindigkeit. Ab einer Feldfrequenz um 100 kHz war die Reduktion der Geschwindigkeit mit der erhöhten Viskosität wieder konsistent. Dieses Verhalten bestätigt, daß im niederfrequenten Bereich die Elektrorotationsspektren der Erythrozyten durch einen elektroosmotischen Beitrag zum Drehmoment bestimmt werden. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse, daß es möglich ist mit Elektrorotation Depletion von Makromolekülen nachzuweisen.

Messungen der elektrophoretischen Mobilität von nativen Erythrozyten wurden in Lösungen mit dem Polyelektrolyten Polystyrensulfonat in Abhängigkeit vom Molekulargewicht (40 kDa bis 2613 kDa) und der Salzkonzentration (15 mM bis 200 mM NaCl) durchgeführt. Es zeigte sich, daß das Polymer zum einen reversibel adsorbiert und zum anderen einen deutlichen Depletionseffekt herbeiführt. Die Mobilität scheint nahezu unabhängig von der Viskosität der Polystyrenesulfonat-Lösungen zu sein. Gleichzeitig verdeutlichten die Ergebnisse die Möglichkeit die Adsorption und Depletion von Polyelektrolyten mit Elektrophorese zu quantifizieren.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die konsekutive Adsorption von Polyelektrolyten mit entgegengesetzten Vorzeichen an fixierten Erythrozyten entwickelt. Durch anschließendes Behandeln der beschichteten Erythrozyten mit einer proteinspaltenden Lösung konnten die Erythrozyten aufgelöst werden ohne die Polyelektrolytschicht zu zerstören. Das Resultat waren Polyelektrolytkapseln in Form von Erythrozyten.

# **1 Einführung**

In elektromagnetischen Feldern erfahren Partikel in Abhängigkeit von ihren elektrischen und magnetischen Eigenschaften Kräfte und Drehmomente. Auch die Wechselwirkungen von Partikeln untereinander und mit Molekülen und Polymeren werden von Parametern wie der Oberflächenladung und der Polarisierung mitbestimmt. Bei der Zell-Zell-Wechselwirkung spielen aber auch gelöste Polymere und die Wechselwirkung dieser mit den Zellen eine entscheidende Rolle. Insofern ist sowohl in der Medizin, Biotechnologie als auch Kolloidchemie ein detailliertes Wissen über die elektrischen Parameter von biologischen Zellen und Kolloiden als auch über deren Zusammenspiel mit Polymeren unerlässlich.

## **1.1 Elektrorotation und Alpha-Dispersion**

Zur Untersuchung von biologischen Zellen und Kolloiden nutzen verschiedene Messmethoden die Wechselwirkung von elektrischen und dielektrischen Partikeleigenschaften mit elektromagnetischen Feldern aus. Bei der Elektrorotation werden die zu messenden Partikel in ein rotierendes elektrisches Feld gebracht. In Abhängigkeit von der Feldfrequenz rotieren die Partikel entgegen oder mit der Feldrichtung. Normalerweise ist die Ursache für die Partikelrotation eine durch Relaxationsprozesse hervorgerufene Phasendifferenz zwischen der durch das angelegte Feld induzierten Polarisierung und dem externen rotierenden Feld [2,51]. Diese Differenz führt zu einem Drehmoment, welches auf das Partikel wirkt. Die Rotationsgeschwindigkeit hängt dabei von der Größe des induzierten Dipolmomentes sowie der hydrodynamischen Reibung ab.

In gleicher Weise ergeben sich die dielektrischen Dispersionsrelationen von Partikelsuspensionen bei Impedanzmessungen aus dem frequenzabhängigen Dipolmoment der Partikel [36]. Es läßt sich unmittelbar folgern, daß Elektrorotationsspektren und Impedanzmessungen in einer engen Wechselbeziehung zueinander stehen [4,106]. In der Vergangenheit konnte dieser Zusammenhang in zahlreichen Arbeiten bestätigt werden, zumindest für Untersuchungen mit

höherfrequenten Wechselfeldern (oberhalb weniger kHz) [3,5,34,38,49,56,82,102]. Prinzipiell folgt aus der engen Verbindung zwischen Elektrorotation und Impedanzmessung, daß die gleichen Zellparameter erfaßt bzw. bestimmt werden. Ein Vorteil bei der Elektrorotation ist die Möglichkeit, die dielektrischen Parameter von einzelnen Zellen zu erfassen. Bei Impedanzmessungen wird hingegen über viele Zellen gemittelt.

Je nach Aufbau und Komplexität der dielektrischen Struktur eines Partikels lassen sich in einem Elektrorotationsspektrum verschiedene Minima und Maxima in Abhängigkeit von der Frequenz beobachten. Jeder einzelne Extremwert kann einem bestimmten Dispersionsprozeß zugeordnet werden. Insbesondere beim Studium dielektrischer Eigenschaften von biologischen Zellmembranen und der inneren Zellstruktur hat sich die Elektrorotation als aufschlußreiche Meßmethode erwiesen [2,37,56,62,90,102,105]. Der Frequenzbereich, in dem ein Großteil dieser Untersuchungen stattfinden, in dem also die dielektrischen Eigenschaften der Zellkompartimente untersucht werden, liegt im Bereich von einigen Kiloherz bis hin zu mehreren Megaherz dem sogenannten  $\beta$ -Dispersionsgebiet. Im wesentlichen spiegeln die Dispersionsrelationen die Polarisierung durch die Unterschiede sowohl der Leitfähigkeit als auch der Dielektrizitätskonstanten zwischen dem Partikel und dem umgebenden Medium wieder. Zum Beispiel zeigen im kHz-Bereich biologische Zellen in Lösungen mit niedriger Ionenstärke ein deutliches Maximum der Elektrorotationsgeschwindigkeit entgegen der Feldrichtung. Dieses Verhalten wird häufig als Pauly-Schwan Dispersion bezeichnet und zeigt den Beginn einer kapazitiven Überbrückung der isolierenden Zellmembran an [88]. Bei Feldfrequenzen im MHz-Bereich erhält man dagegen ein Rotationsmaximum parallel zur Feldrichtung, welches die sogenannte Maxwell-Wagner Dispersion zeigt. Diese wird durch Leitfähigkeitsunterschiede zwischen dem Zellinneren und der umgebenden Lösung hervorgerufen [106]. In der Vergangenheit haben sich zahlreiche Arbeiten mit den zu Grunde liegenden Mechanismen beschäftigt [47,51,63,88].

Jüngere Elektrorotationsmessungen haben gezeigt, daß im niederfrequenten bzw. im  $\alpha$ -Dispersionsgebiet Dispersionsrelationen auftreten, die der Äquivalenz zwischen der Elektrorotation und der Impedanz, wie man es für die Pauly-Schwan und Maxwell-Wagner Dispersion kennt, nicht mehr gehorchen [4,16,79,110]. Messungen der

Impedanz im Bereich niederfrequenter dielektrischer Dispersion zeigen eine abnehmende dielektrische Permittivität mit zunehmender Frequenz [68,67,66]. Innerhalb des bisherigen Konzepts sollte dieses Verhalten eine zum äußeren rotierenden Feld antiparallele Rotation des Partikels zur Folge haben. Statt dessen wird häufig eine parallele Rotation beobachtet.

Theoretische Konzepte zur Beschreibung der Elektrorotation von geladenen Partikeln im  $\alpha$ -Dispersionsgebiet nehmen als Ursache eine Konzentrationspolarisation der elektrischen Doppelschicht an [95]. Wenn ein geladenes Partikel in ein elektrisches Feld gebracht wird, werden um den Partikel herum Abweichungen der Elektrolytkonzentration vom Gleichgewichtszustand induziert. Diese Abweichungen führen zu einem asymmetrischen Aufbau der elektrischen Doppelschicht. Auf dieser Grundlage aufbauend wurden die dielektrischen Dispersionsrelationen unter der Voraussetzung einer dünnen Doppelschicht berechnet [44,94,95]. Eine zusätzlich Verallgemeinerung für eine dicke Doppelschicht, die sich nicht im lokalen Gleichgewicht befindet, wurde von DeLacey und White definiert [24]. Die Relaxationszeiten der Konzentrationspolarisation sollten vergleichbar sein mit der Diffusionszeit über eine Distanz, die im Bereich des Partikelradius liegt. Es zeigt sich, daß die so abgeschätzten inversen Relaxationszeiten in der gleichen Größenordnung liegen wie der Frequenzbereich, in dem die  $\alpha$ -Dispersion beobachtet wird.

Da die Konzentrationspolarisation die Verteilung der Polarisationsladungen beeinflusst, beeinflusst sie das gesamte induzierte Dipolmoment des Partikels und der Doppelschicht. Theoretische Bemühungen, welche die Elektrorotation im  $\alpha$ -Dispersionsgebiet auf diesen Grundlagen unter Berücksichtigung des gesamten induzierten Dipolmomentes erklären wollten, führten immer zu einer Rotation entgegen der Drehrichtung des Feldes. Experimentelle Daten, die eine deutliche Rotation mit dem Feld im  $\alpha$ -Dispersionsgebiet zeigen, konnten nicht erklärt werden. Erst kürzlich gelang Grosse und Shilov [58] zum Verständnis der Elektrorotation im niederfrequenten Bereich ein signifikanter Fortschritt. Sie zeigen in ihrem Modell, daß die Rotation bei niedrigen Feldfrequenzen nicht nur durch das Drehmoment hervorgerufen wird, welches durch die Wechselwirkung zwischen dem externen Feld und dem induzierten Dipolmoment entsteht, sondern auch durch Elektroosmose. Diese zusätzliche



Komponente äußert sich in einer relativen Bewegung der äußeren Doppelschicht zur Partikeloberfläche. Diese relative Bewegung wird durch Wirkung der Tangentialkomponente des externen rotierenden Feldes auf die phasenverschobenen Polarisationsladungen in der Doppelschicht verursacht. Die Folge sind räumliche Kräfte auf die Ladungsverteilungen innerhalb der Doppelschicht, welche zu einer Bewegung der Ionenwolken tangential zur Oberfläche führen. Dieses Phänomen läßt sich am besten als elektroosmotischer Schlupf des äußeren Teils der Doppelschicht relativ zur Oberfläche des Partikels umschreiben. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen ist der Einfluß dieses Effektes auf die Partikelrotation größer als der Beitrag, den die Wechselwirkung zwischen dem induzierten Dipolmoment und dem elektrischen Feld liefert. Durch diesen Zusammenhang läßt sich dann eine Rotation in Feldrichtung erklären. Näheres zu dieser Theorie wird im Kapitel 3.1.3 erläutert.

In der Vergangenheit wurde der Elektrorotation im  $\alpha$ -Dispersionsgebiet nicht all zu viel Aufmerksamkeit geschenkt, obwohl die Existenz sowohl für lebende Zellen als auch Kolloide hinreichend bekannt ist [4,6,57,61,87,107,109,108]. Das Kapitel 4 beschäftigt sich im wesentlichen mit der Elektrorotation im  $\alpha$ -Dispersionsbereich von fixierten Erythrozyten [52,84]. Die experimentellen Daten werden mit dem theoretischen Modell nach Grosse und Shilov [58] verglichen.

## **1.2 Adsorption und Depletion von Polymeren an Partikeloberflächen**

Ein detailliertes Verständnis vom Verhalten von Polymeren an Grenzflächen hat sowohl in technologischen Bereichen als auch in der Grundlagenforschung eine große Bedeutung [46,83]. Sowohl die Adsorption als auch die Depletion von Polymeren an Grenzflächen spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Dispersionen. Vor allem bei kleineren Polymerkonzentrationen kann die Adsorption eines Makromoleküls gleichzeitig an der Oberfläche verschiedener Partikel erfolgen, sofern das Molekulargewicht des Polymers genügend groß ist. Es kommt zur sogenannten Überbrückungsflockung. Wenn hingegen die Polymerkonzentration genügend groß ist, kann dies zur Ausbildung von Polymerschichten auf den Oberflächen von Zellen oder Kolloiden führen. Diese Schichten führen zu einem bestimmten Mindestabstand

(sterische Barriere) zwischen solchen beschichteten Partikeln und verhindern so Aggregation und Koagulation [42].

Die Ausbildung von Depletionschichten durch Polymere an Grenzflächen zwischen festen und flüssigen Phasen findet statt, wenn die Abnahme der Konfigurationsentropie der Polymere nahe der Grenzfläche nicht durch eine positive Wechselwirkungsenergie ausgeglichen wird [46]. Eine direkt abstoßende Wechselwirkung zwischen Oberfläche und Polymer ist nicht nötig. Die Ausbildung einer Depletionschicht führt zu einer Abnahme der Segmentdichte des Polymers mit abnehmender Distanz zur Oberfläche. Eine Konsequenz ist die ortsabhängige Abnahme des osmotischen Druckes. Für zwei sich nähernde Partikel kann dies zu einer attraktiven Depletionwechselwirkung führen, die in einer reversiblen Koagulation resultiert [45,104]. Voraussetzung für diese Ausflockung ist, daß die Energie der osmotischen Anziehung durch die Depletionschicht größer ist als der Verlust durch die Abnahme der Konfigurationsenthalpie. Auch bei Erythrozyten spielt die Existenz von Depletionschichten an der Zelloberfläche eine wichtige Rolle. So wird z.B. bei der Aggregation und Disaggregation von Erythrozyten in Dextranlösungen neben dem Modell der Brückenbindung die attraktive Zellwechselwirkung auf der Grundlage einer attraktiven Depletionwechselwirkung diskutiert [7,11]. In der Vergangenheit haben sich zahlreiche Arbeiten mit der Ausdehnung und Struktur von Depletionschichten beschäftigt [21,33,72,103].

### 1.2.1 Polymerdepletion

In Lösungen mit löslichen und nicht adsorbierenden Polymeren können Partikel unerwartet hohe elektrophoretische Mobilitäten aufweisen [14,15,96]. Dieser Effekt kann durch eine geringere Viskosität an der Grenzfläche des Partikels zur Lösung interpretiert werden, was durch einen Depletioneffekt hervorgerufen wird [7]. Die Ursache für die Sensitivität dieser elektrokinetischen Untersuchungsmethode auf die Viskosität im Nanometerbereich der Zelloberfläche liegt daran, daß der elektroosmotische Fluß außerhalb der elektrischen Doppelschicht exponentiell abnimmt. Dies führt dazu, daß die Mobilität im wesentlichen nur von der Viskosität innerhalb der Doppelschicht abhängt. Durch Variation der Ionenstärke läßt sich die

Ausdehnung der Doppelschicht variieren, ohne die Größe der Depletionsschicht zu verändern. Auf diese Weise kann durch Variation der Ionenstärke das Ausmaß einer Depletionsschicht bestimmt werden. So lange die Doppelschicht deutlich kleiner ist als die Depletionsschicht wird auch die Mobilität deutlich über der nach Smoluchowski's Formel vorhergesagten liegen. Wenn die Debye-Länge größer wird als die Ausdehnung der Depletionsschicht, nähert sich die gemessene Mobilität bzw. das  $\zeta$ -Potential den nach der Viskosität der Lösung zu erwartenden Werten.

Für den Fall einer glatten Oberfläche läßt sich der Depletionseffekt theoretisch in einer linearen Näherung beschreiben. Auf dieser Grundlage konnte die Dicke der Depletionsschicht sowie die Viskosität an der Zelloberfläche durch die elektrophoretischen Mobilitäten von Erythrozyten in Dextranlösungen bestimmt werden [7,31,89]. Viele Oberflächen weisen jedoch keine glatte Struktur auf. Wie auch beim Erythrozyten werden sie von einer Schicht umgeben, innerhalb derer ein hydrodynamischer Fluß möglich ist. Die elektrischen Oberflächenladungen verteilen sich in dieser Schicht. Solche Oberflächen bezeichnet man als "haarige" oder "weiche" [85] Oberflächen. Theoretische Modelle, welche die Hydrodynamik in der geladenen Schicht berücksichtigen, ermöglichen unter anderem nähere Angaben zur Ladungsverteilung innerhalb dieser Schicht [10,27].

Ein vergleichbarer Zusammenhang wie zwischen der Mobilität und Polymerdepletionsschichten ist auch bei der niederfrequenten Elektrorotation zu erwarten. Nach der am Anfang dieses Kapitels erwähnten Theorie von Grosse und Shilov [58] liegt die Ursache der Elektrorotation im  $\alpha$ -Dispersionsbereich an einer Polarisierung der elektrischen Doppelschicht. Diese führt in Wechselwirkung mit dem externen Feld zu einem elektroosmotischen Fluß, welcher bei genügend niedrigen Frequenzen die Partikelrotation induziert. Bei hohen Frequenzen läßt sich hingegen dieses Phänomen nicht mehr beobachten. Sofern diese Theorie die  $\alpha$ -Dispersion richtig beschreibt, ist also zu erwarten, daß im niederfrequenten Bereich Polymerdepletionsschichten einen vergleichbaren Einfluß auf die Rotationsgeschwindigkeit haben wie bei der Elektrophorese auf die Mobilität. Im Gebiet der  $\beta$ -Dispersion sollte dagegen ein Einfluß von Polymerdepletion auf die Rotation nicht zu beobachten sein.

Die Untersuchung von Depletionschichten durch Elektrorotation stellt also auch eine Möglichkeit zur Charakterisierung des zu Grunde liegenden Mechanismus der  $\alpha$ -Dispersion dar. Im Kapitel 5 wird zu diesem Zweck die Elektrorotation von fixierten Erythrozyten in Dextranlösungen untersucht [9]. Neben dem  $\alpha$ -Dispersionsgebiet wird dabei auch auf den Übergang zum  $\beta$ -Dispersionsgebiet eingegangen.

Auch die Wechselwirkung von Polyelektrolyten mit Zelloberflächen spielen in der Biologie und der Medizin eine wichtige Rolle. So wird zum Beispiel die Aggregation von Erythrozyten auch durch das negativ geladene Fibrinogen im Blutplasma verursacht [41]. Unklar ist jedoch, ob dies von einer Adsorption des Makromoleküls begleitet wird.

Bei der Adsorption und der Depletion von Polyelektrolyten sind die elektrostatischen Kräfte von entscheidender Bedeutung. Zumal diese Kräfte mit der Ladungsdichte von Polymer und Partikeloberfläche und der Salzkonzentration stark variieren, hängt die absolute Adsorption und auch die Depletion von diesen beiden Größen ab. Oft wird bei niedrigen Salzkonzentrationen nur eine geringe Adsorption bis hin zu gar keiner beobachtet [46]. Bei Zugabe von Salz steigt der adsorbierte Betrag dagegen häufig an. Dieses Verhalten liegt in der elektrostatischen Abschirmung begründet, die mit der Salzkonzentration zunimmt. Es wird aber auch genau das Gegenteil beobachtet, wenn z.B. eine reine Elektrosorption vorliegt, d.h. die Ladungen vom Polymer und der Oberfläche entgegengesetzte Vorzeichen haben.

Im Kapitel 6.1 werden elektrophoretische Untersuchungen an nativen Erythrozyten in Lösungen mit negativ geladenem Polystyrensulfonat vorgestellt. Die Versuche werden hinsichtlich möglicher Rückschlüsse auf die Adsorption und die Depletion dieses Polymers diskutiert.

### **1.2.2 Mehrschichtadsorption von Polymeren**

Die Herstellung und Untersuchung dünner organischer Filme erweckt insbesondere wegen der zahlreichen möglichen Anwendungen sowohl in technologischen als auch biotechnologischen Bereichen großes Interesse [43,75]. Eine Möglichkeit zum Aufbau dünner Filme auf geladenen Festkörperoberflächen und Kolloiden ist die Verwendung entgegengesetzt geladener Polyelektrolyte [23,29]. Bei dieser Methode werden die Oberflächen abwechselnd mit Lösungen aus entgegengesetzt geladenen Polymeren

behandelt. Auf diese Weise lassen sich kontrolliert Schichten im Bereich von einigen Nanometern Dicke konstruieren. Durch Verwendung unterschiedlicher Polyelektrolyte kann der Aufbau im Prinzip beliebig komplex gestaltet werden. Durch den Einbau anderer Materialien wie Proteine, Farbstoffe oder Nanopartikel können sie mit einer Vielzahl von speziellen Eigenschaften konstruiert werden [20,71,74,78,91,100]. So ermöglicht zum Beispiel der Einbau von Proteinen in Polyelektrolytschichten diese als Biosensoren zu verwenden [22]. Mit unterschiedlichen Messmethoden wie Ellipsometrie, Neutronenstreuung, Infrarot- und UV-VIS-Spektroskopie, Röntgenreflexion und Quarzkristallmikrodifferenz-Gravimetry wurden solche Schichten bereits untersucht [19,65,69,76,92,101]

Erst kürzlich wurde die konsekutive Adsorption von Polyelektrolyten an geladenen Polystyren Latex Partikeln untersucht [18,29,64,98,99]. Durch die Verwendung von löslichen Partikeln gelang durch Auflösen des Kernes nach der Adsorption von mehreren Schichten die Konstruktion von hohlen Polyelektrolytkapseln mit einem Durchmesser zwischen 100 nm und 10  $\mu$ m [30]. Dazu wurden zunächst mehrere Polymerschichten auf die Partikel gebracht und diese anschließend durch Senkung des pH aufgelöst. Nach dieser Behandlung bleiben nur die Polyelektrolytschichten in Form von Hüllen übrig. Kapseln in dieser Größenordnung sind sowohl von wissenschaftlichem als auch technologischem Interesse. So werden zum Beispiel Liposomen zum einen zur Modellierung biologischer Membranen verwendet und haben außerdem in der Pharmazie als auch in der Kosmetik eine große Bedeutung als Transportmittel für Arzneimittel erlangt [73].

Ein besonderes Merkmal der Polyelektrolytkapseln ist, daß sie sich sowohl in ihrer Zusammensetzung als auch in ihrer Schichtdicke kontrolliert herstellen lassen. Weiterhin haben diese Hüllen im Gegensatz zu Liposomen [73] die Eigenschaft durchlässig für kleinere polare Moleküle zu sein [18,69,70] und sind extrem stabil gegen chemische und physikalische Einflüsse.

In Rahmen dieser Arbeit wurde die Möglichkeit untersucht, Polyelektrolythüllen auf der Grundlage von biologischen Zellen herzustellen. Dies ist insofern wünschenswert, als daß man monodisperse Kapseln in einer großen Vielgestaltigkeit über einen weiten Größenbereich fertigen könnte. Dazu wurde zunächst ein Verfahren zur

Mehrfachbeschichtung von Glutaraldehyd fixierten Erythrozyten entwickelt. Anschließend folgte das Auflösen der Erythrozyten mit einer proteinspaltenden Lösung. Auf diese Weise gelang es Polyelektrolytkapseln in der Form und Größe von Erythrozyten zu konstruieren. Die Resultate und die sich aus diesem Verfahren ergebenden Möglichkeiten werden im Kapitel 6.2 vorgestellt.

## 2 Experimentelle Methoden

Dieses Kapitel dient zum einen der Erläuterung der verwendeten Meßmethoden, und zum anderen sollen die einzelnen Schritte bei der Herstellung von Proben und Meßlösungen beschrieben werden.

### 2.1 Meßmethoden

#### 2.1.1 Elektrorotation

Zur Aufnahme der Elektrorotationsspektren standen zwei Frequenzgeneratoren (FOKUS, Giesenhorst) mit den Frequenzbereichen 10Hz-2,5kHz und 260Hz-33MHz (Spannungsbereich von 2,5-13 V) zur Verfügung, die Rechtecksignale liefern. Gemessen wurde zum einen in einer Mikroammer mit einem Elektrodenabstand von 200 µm und 250 µm (siehe Bild 2.1). Weiterhin wurde eine Kammer mit einem Elektrodenabstand von einem Millimeter eingesetzt. Das Volumen dieser Kammer betrug etwa 850 µm<sup>3</sup>, was die Leitfähigkeitsmessung nach der Aufnahme der Spektren erlaubte. Wenn die Leitfähigkeit leicht angestiegen war, wurde dieser Wert angegeben und für theoretischen Berechnungen verwendet.

Sofern es bei den experimentellen Daten nicht anders angegeben wird, wurden für jeden Messpunkt die Rotationsgeschwindigkeiten von 3-8 Zellen gemessen. Bei Versuchen mit Erythrozyten wurde die Rotation von absedimentierten Zellen um ihre kurze Achse gemessen. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur ausgeführt (22°C).

Zur Bestimmung der charakteristischen Feldfrequenzen mit einem Maximum der Rotationsgeschwindigkeit wurden die experimentellen Daten in eine Glockenkurve gelegt [39]:

$$R = \frac{2R_{\max} \frac{f}{f_{\max}}}{1 + \left( \frac{f}{f_{\max}} \right)^2} \quad (2.1)$$

$R$ ,  $R_{\max}$ ,  $f$  und  $f_{\max}$  stehen jeweils für die Rotationsgeschwindigkeit, die maximale Rotationsgeschwindigkeit, die Feldfrequenz und die Feldfrequenz mit maximaler Rotation. Je nach Form des Spektrums wurden zur Abschätzung der Frequenz drei und mehr Messpunkte berücksichtigt. Um den oder die Nulldurchgänge  $f_0$  zu berechnen, wurde von der folgenden linearen Abschätzung ausgegangen [39]:

$$\log f_0 = \frac{R_1 \log f_2 - R_2 \log f_1}{R_1 - R_2} \quad (2.2)$$

Hier stehen  $f_1$  und  $f_2$  für zwei Feldfrequenzen unterhalb und oberhalb des Nulldurchganges mit den Rotationsgeschwindigkeiten  $R_1$  und  $R_2$ .

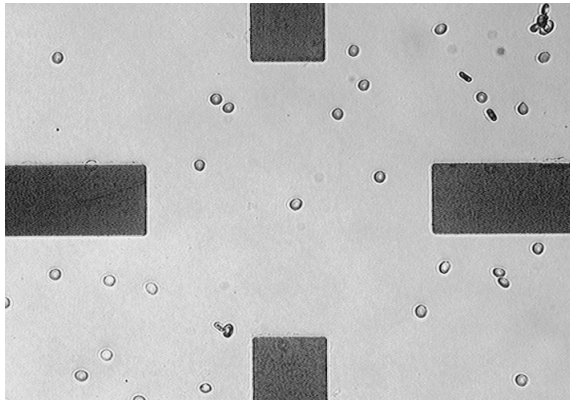


Bild 2.1: Mikroskopische Aufnahme einer Mikrokanalplatte mit einem Elektrodenabstand von 200 µm, welche mit einer Erythrozytensuspension gefüllt ist.

### 2.1.2 Elektrophorese

Zur Messung der elektrophoretischen Mobilität wurde das kommerzielle Elektrophoresegerät *ELECTROPHOR* der Firma HaSoTec verwendet [59]. Im wesentlichen handelt sich dabei um eine Apparatur die auf einem Echtzeitbildverarbeitungssystem sowie einer speziellen Tracking Prozedur beruht. Es ermöglicht gleichzeitig die Messung der elektrophoretischen Mobilität, der Größe und der Sedimentation von einzelnen Zellen.

Die Erfassung von Partikeln in der Elektrophoresekanalplatte erfolgt über ein Mikroskop und eine Videokamera. Ein Computer mit einem Bilddigitalisierer erfasst die Bewegung und die Parameter der Partikel. Die Elektrophoresekanalplatte ist durch semipermeable Membranen von den Elektroden getrennt. Zwei separate Elektrolytkreisläufe an den beiden Platinelektroden schützen die Partikel vor Elektrolyseprodukten. Die



Probenzufuhr erfolgt automatisch zwischen den einzelnen Messzyklen. Dies garantiert die Erfassung unterschiedlicher Zellen in jedem Zyklus.

Zur Bestimmung einzelner Messpunkte wird in der Regel über mehrere hundert einzelne Messwerte gemittelt. Bei der Angabe von Fehlern ist im Zusammenhang mit der Elektrophorese immer die empirische Standardabweichung zu verstehen.

### 2.1.3 Durchflußzytometer

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage der Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Sie ermöglicht die simultane Messung von der relativen Zellgröße, der Granularität sowie zwei bis drei verschiedener Fluoreszenzfarben an einzelnen Zellen. Zur Analyse wird eine Zellsuspension über ein Schlauchsystem mittels Überdruck in den Messbereich geführt. Die Zellkonzentration liegt dabei um  $10^6$  Partikel/ml. Beim Durchtritt durch eine Düse kommt es zur Beschleunigung des Zellflusses, zur Auftrennung von kleineren Zellaggregaten und zur Hintereinanderreihung der Zellen (hydrodynamische Fokussierung). Durch Variation der Düsengröße lassen sich Partikel mit einem Durchmesser von 0,5-100µm messen. Am Analysepunkt trifft ein monochromatischer Laserstrahl auf die einzelnen vorbeiströmenden Zellen. Die Streulicht und Fluoreszenzsignale werden durch Photomultiplier erfaßt. Das verwendete Durchflußzytometer *FACScan* (Becton Dickinson) arbeitet mit einem Argon-Ionen-Laser bei einer Wellenlänge von 488nm.

### 2.1.4 Mikroskopische Verfahren

#### Kraftmikroskop (AFM)

Das Kraftmikroskop liefert die Möglichkeit Oberflächen bis hin zu atomarer Auflösung abzubilden. Das Grundprinzip ist dabei, daß eine Spitze an einem Cantilever so dicht über einer Probe positioniert wird, daß es zu einer Wechselwirkung zwischen Probe und Sonde kommt. Die Kraft zwischen Probe und Sonde spiegelt sich dann in der Auslenkung des Cantilevers wieder. Der Abstand der Spitze zur Probe sowie die Position in der Probenebene werden über Piezokristalle gesteuert. Um nun ein Abbild der Probe zu erhalten unterscheidet man unterschiedliche Verfahren. Im Kontakt-Modus

wird die Spitze quasi in Kontakt mit der Probe über diese gerastert. Entweder wird die Auslenkung des Cantilevers gemessen oder die Auslenkung des Cantilevers (also die Kraft bzw. der Sonden-Proben Abstand) wird konstant gehalten. Im zweiten Fall wird die Topographie durch die Spannungsdifferenzen des Piezokristalles, der den Abstand reguliert, wiedergegeben. Im sogenannten *tapping*- Modus oszilliert der Cantilever (100 Hz – 1 MHz), so daß die Spitze nur flüchtig in Kontakt mit der Probe kommt. Die Änderungen der Spitzen-Oszillationen werden in ein Bild umgewandelt.

Für die Aufnahmen mit dem AFM wurden die Proben getrocknet und anschließend am Nanoscope III vermessen. Die Messungen wurden von Ch. Dürr vom Max Planck Institut für Kolloid und Grenzflächenforschung in Berlin durchgeführt.

### **Konfokales Laser Raster Mikroskop (CSLM)**

Das konfokale Laser Mikroskop ist ein neueres mikroskopisches Verfahren, um hoch aufgelöste dreidimensionale Aufnahmen von unterschiedlichen biologischen und nichtbiologischen Objekten zu erhalten. Beim CSLM wird ein Laser durch ein Linsenaufbau auf einen kleinen fluoreszenten Ausschnitt des zu untersuchenden Objektes fokussiert. Das Streulicht und das Fluoreszenzlicht wird durch die gleiche Optik auf einen Photodetektor fokussiert, wobei das Streulicht durch einen dichroitischen Filter vom Fluoreszenzlicht getrennt wird. Ein Blende vor dem Photomultiplier filtert das Fluoreszenzlicht von Bereichen, welche nicht im Fokus lagen heraus. Mit dem Fokus des Lasers kann nun die Probe Punkt für Punkt gerastert werden, wodurch man die Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von den Raumkoordinaten erhält. Das Resultat ist eine dreidimensionale Intensitätsverteilung.

Die Messungen mittels konfokaler Mikroskopie wurden von P. Klein und C. Reichle aus der Abteilung für Membranphysiologie der Humboldt Universität zu Berlin durchgeführt.

### **Rasterelektronenmikroskop (SEM)**

Für die Aufnahmen mit einem Rasterelektronenmikroskop wurden die Proben zunächst getrocknet und anschließend mit Gold bedampft. Die Proben wurden anschließend mit einem Zeiss DSM 40 bei einer Beschleunigungsspannung von 15 keV aufgenommen.

Die SEM Messungen wurden von J. Hartmann und R. Pitschke vom Max Planck Institut für Kolloid und Grenzflächenforschung in Berlin durchgeführt.

### **Transmissionselektronenmikroskop (TEM)**

Für die Aufnahmen mit einem Transmissionselektronenmikroskop wurden die Zellen nach einer Standardprozedur für biologische Objekte zubereitet. Die Schnitte wurden in einem EM 906 der Firma Zeiss bei 80 kV betrachtet.

Die TEM Messungen wurden von G. Holland vom Institut für Anatomie der Charité durchgeführt.

## **2.2 Proben und Messlösungen**

### **2.2.1 Messlösungen**

Zur Zubereitung der Messlösungen wurde zweifach destilliertes Wasser verwendet. Die erforderlichen Ionenstärken wurden mit Natriumchlorid und zum Teil auch mit Kaliumchlorid eingestellt (sofern im experimentellen Teil nichts anderes angegeben wird). Sofern erforderlich wurde Phosphatpuffer zu den Lösungen hinzu gegeben, um einen pH von 7,4 einzustellen. Bei nativen Blutzellen wurde bei geringen Ionenstärken die Osmolarität durch Zugabe von Saccharose hergestellt. Die Viskositäten wurden mit einem Kapillarviskosimeter bestimmt [8].

### **Polymere**

Für die Dextranlösungen (Kapitel 5) wurde 71 kDa, 464 kDa und 2400 kDa Dextran der Firma *Pharmacia* aus Schweden verwendet.

Für die Untersuchungen in Lösungen mit Polystyrenesulfonatnatriumsalz (PSS) (Kapitel 6.1) wurde PSS mit einem mittleren Molekulargewicht  $M_W = 70$  kDa und  $M_W = 1000$  kDa von *SIGMA Aldrich* sowie PSS mit  $M_W = 48,6$  kDa,  $M_W = 350$  kDa,  $M_W = 990$  kDa und  $M_W = 2,61$  kDa von Polymer Standards Service (Mainz) verwendet.

Bei den Experimenten zur Adsorption von Polymeren auf der Oberfläche fixierter Erythrozyten (Kapitel 6.2) wurde zum einen negativ geladenes PSS ( $M_W = 70$  kDa) von *SIGMA* und zum anderen positiv geladenes Polyallylaminehydrochlorid (PAH,  $M_W = 50-60$  kDa) von *Aldrich* verwendet.

### 2.2.2 Erythrozyten

EDTA-Vollblut von freiwilligen Spendern (mit schriftlicher Zustimmung) wurde innerhalb von einer Stunde nach Abnahme mit Hilfe einer Zentrifuge (1400 g, 10 min) separiert. Das Plasma sowie der Buffy-coat wurden abgenommen. Anschließend folgte zweimaliges Waschen in einer isotonen mit Phosphatpuffer gepufferten Kochsalzlösung (PBS) (Phosphatpuffer 5,8 mM mit pH 7,4, Kaliumchlorid 5,6 mM, Natriumchlorid 150 mM) im Verhältnis 1:10.

Neuraminidase (*vibrio cholerae*) von SIGMA wurde zum Abbau der N-Acetylneuraminsäure von der Erythrozytenoberfläche verwendet [40]. Dazu wurden 100 µl Erythrozytenkonzentrat in 900 µl Inkubationslösung (110 mM NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>) gegeben, die jeweils 0, 2, 5, 20 und 100 µl einer Einheit Neuraminidase enthielten. Diese Proben wurden bei 37°C leicht agitiert. Nach einer Stunde wurde die Behandlung durch Zugabe von jeweils 9 ml PBS (4°C) unterbrochen. Es folgte dreimaliges Waschen in PBS (110 g, 5 min). Anschließend folgte die Fixierung (s.u.) der behandelten und unbehandelten Zellen mit Glutaraldehyd.

#### Fixierung

Die Fixierung der Erythrozyten erfolgte mit Glutaraldehyd (GA). Dazu wurden zu 2ml einer Erythrozytensuspension (Hämatokrit ca. 0,4) tröpfchenweise mit einer isotonen GA-Lösung (1 Teil GA: Grade I: 25% Aqueus von Sigma und 9 Teile PBS) aufgefüllt bis eine Endkonzentration von 2 % GA erreicht wurde. Nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten bei 20°C wurde die Lösung abzentrifugiert (110 g, 5 min) und die Erythrozyten viermal in zweifach destilliertem Wasser gewaschen (110 g, 5 min).

Um Echinozyten herzustellen, wurden Erythrozyten mit Acetylsalicylsäure behandelt. Dazu wurde zunächst von frischem EDTA-Vollblut das Plasma sowie der Buffy-Coat abzentrifugiert, gefolgt von zweimaligem Waschen in PBS (s.o.). Anschließend wurden 0,5 ml des Sediments mit 0,5 ml PBS aufgefüllt. Diese Suspension wurde mit 1 ml Aspisol (0,9 g DL-Lysinmono(acetylsalicylat), entsprechend 0,5 g Acetylsalicylsäure, und 0,1 g Aminoessigsäure in 5 ml H<sub>2</sub>O) aufgefüllt. Nach einer Einwirkzeit von 10min bei 20°C erfolgte die Fixierung mit Glutaraldehyd (s.o.).

### 2.2.3 Thrombozyten

1 ml Thrombozytenkonzentrat von freiwilligen Spendern, welches durch Thrombopherese gewonnen wurde, wurde in 5 ml Zitronensäurepuffer (pH=6,5, Zitronensäure 7,56 g/l, Glucose 0,9 g/l, HCl 0,37 g/l, NaCl 5,26 g/l, EDTA-Na 3,72 g/l) gewaschen (450 g, 10 min). Nach der Entfernung des Überstandes erfolgte erneutes Waschen in isotoner Saccharoselösung (450 g, 10 min).

#### Fixierung

Zur Fixierung von Thrombozyten wurde 1ml einer gepufferten Formaldehydlösung (10 %) zu 5 ml Thrombozytenkonzentrat gegeben, um eine endgültige Formaldehydkonzentration von knapp 1,7 Prozent zu erhalten. Nach einer Einwirkzeit von 20 Minuten wurden die fixierten Thrombozyten abzentrifugiert und anschließend dreimal in destilliertem Wasser gewaschen (jeweils 450 g, 10 min).

### 2.2.4 Polymeradsorption & Hüllenpräparation

Die Beschichtung von fixierten Erythrozyten erfolgte mit positiv geladenem Polyallylaminhydrochlorid (PAH) und negativ geladenem Na-Polystyrensulfonat (PSS). Zur Adsorption des jeweiligen Polymers wurden 2-4 ml 0,5 M NaCl-Lösung mit 0,5 g/dl PAH bzw. 0,5 M PSS verwendet. Die Volumenkonzentration der Erythrozyten betrug ca. 2,5 %. Nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten bei 20°C wurden die Erythrozyten zunächst abzentrifugiert und anschließend dreimal in einer 154 mM Kochsalzlösung gewaschen (110 g, 5 min).

Zur Präparation von Erythrozytenhüllen wurden als erstes fixierte Zellen mehrmals mit PAH und PSS beschichtet. Nach dem Aufbringen von insgesamt zehn Schichten folgte die Behandlung mit einer Lösung zum Abbau der Proteine. Dazu wurden die beschichteten fixierten Erythrozyten in eine Lösung mit 1,2 % NaOCl gegeben. Die Einwirkzeit betrug ca. 20 Minuten bei 20°C. Anschließend wurden die Erythrozytenhüllen dreimal in einer 145 mM Natriumchloridlösung gewaschen.

### 3 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden zunächst die Grundlagen zur Elektrorotation im  $\alpha$ - und im  $\beta$ -Dispersionsgebiet vorgestellt. Für den  $\beta$ -Dispersionsbereich wird dazu auf zwei theoretische Modelle eingegangen. Zunächst wird das sogenannte Einschalen-Modell beschrieben, welches unter anderem zur Interpretation von Erythrozytenspektren verwendet wird. Anschließend wird das kubisch strukturierte Modell erläutert. Das kubisch strukturierte Modell stellt eine Erweiterung des Einschalen-Modells dar und wird bei der Beschreibung von Thrombozytendaten Verwendung finden. Im anschließenden Abschnitt folgt die Darstellung der erst kürzlich entwickelten Theorie [58] zur Elektrorotation im Niederfrequenzbereich. Im zweiten Teil dieses Kapitels wird der Einfluß von Polymerdepletionschichten auf die elektrophoretische Mobilität von Zellen und Kolloiden erläutert.

#### 3.1 Elektrorotation

Elektrorotation im Bereich der  $\beta$ -Dispersion wird durch die Relaxationszeit der durch das externe Feld induzierten Polarisationsladungen bestimmt. Durch eine frequenzabhängige Phasenverschiebung  $\varphi$  zwischen dem induzierten Dipolmoment  $p$  und dem äußeren Feld  $E$  kommt es zu einer Wechselwirkung, die in einem Drehmoment  $N$  resultiert (siehe Bild 3.1):

$$N = p \times E \quad (3.1)$$

Dieses Drehmoment führt zu einer frequenzabhängigen Rotationsgeschwindigkeit der Zelle oder des Partikels. Bei der Elektrorotation werden die Rotationsgeschwindigkeiten  $\omega_p$  der rotierenden Partikel im stationären Zustand gemessen, also wenn sich ein Gleichgewichtszustand zwischen dem feldinduzierten Drehmoment  $N$  und dem Reibungsmoment  $N_R$  eingestellt hat.  $\omega_p$  ist im stationären Zustand konstant. Bei kleinen Rotationsgeschwindigkeiten gilt für das Reibungsmoment einer Kugel mit dem Radius  $a$  in einer Lösung mit der Viskosität  $\eta$ :

$$N_R = 8\pi\eta a^3 \omega_p \quad (3.2)$$

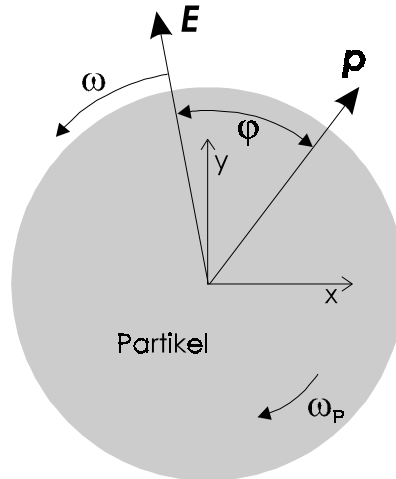


Bild 3.1: Partikel in einem rotierendem elektrischen Feld  $E$  mit dem induzierten Dipolmoment  $p$ .  $\omega$  und  $\varphi$  stehen jeweils für die Feldfrequenz und für die Phasenverschiebung zwischen dem Feld und dem Dipolmoment.

Um die Rotationspektren von Partikeln zu interpretieren, werden geeignete Modelle benötigt, die das frequenzabhängige Dipolmoment als Funktion der dielektrischen Zellparameter berechnen.

### 3.1.1 Drehmoment von einschaligen Objekten

Zunächst wird von einer Zelle ausgegangen werden, die aus  $n$  sphärischen Zonen besteht [50,51,86]. Die einzelnen Zonen sollen homogen sein mit der Leitfähigkeit  $G_k$  und der Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon_k$ . Der Index  $k$  gibt die Nummer der Zone an, wobei von der innersten zur äußersten Zone gezählt wird ( $k=1,2,\dots,n$ ). Im Falle eines homogenen elektrischen Feldes kann nun das Potential jeder Zone wie folgt ausgedrückt werden:

$$\varphi_{0k} = A_k r + \frac{B_k r}{|r|^3} \quad (3.3)$$

Die Koeffizienten  $A_k$  und  $B_k$  sind Vektoren und  $r$  ist der Ortsvektor mit dem Ursprung im Zentrum der Zelle. In der ersten Zone gilt  $B_1 = 0$  und außerhalb der Zelle folgt:

$$\varphi_0 = E_0 r + \frac{p r}{|r|^3} \quad (3.4)$$

An jeder Schnittstelle zwischen zwei Zonen muß nun zum einen die Randbedingung gelten, daß die Potentiale kontinuierlich ineinander übergehen ( $k = 1,2,\dots,n-1$ )

$$\begin{aligned}\varphi_{0k} &= \varphi_{0k+1} \\ \varphi_{0n} &= \varphi_0\end{aligned}\tag{3.5}$$

und außerdem, daß die Ladungen erhalten bleiben ( $i = \sqrt{-1}$ )

$$\begin{aligned}(G_k + i\omega\epsilon_k)\frac{\partial\varphi_{0k}}{\partial r} &= (G_{k+1} + i\omega\epsilon_{k+1})\frac{\partial\varphi_{0k+1}}{\partial r} \\ (G_n + i\omega\epsilon_n)\frac{\partial\varphi_{0n}}{\partial r} &= (G_e + i\omega\epsilon_e)\frac{\partial\varphi_{0e}}{\partial r}\end{aligned}\tag{3.6}$$

$G_e$  und  $\epsilon_e$  sind jeweils die externe Leitfähigkeit und Dielektrizitätskonstante. Durch die Gleichungen (3.5) und (3.6) gibt es nun  $2n$  Gleichungen zu  $2n$  Unbekannten, was die Berechnung von  $p$  ermöglicht.

Relativ übersichtlich bleibt die Lösung der Gleichungen (3.5) und (3.6) für einschalige Objekte (Bild 3.2). In diesem Fall wird die Zelle durch eine Kugel mit dem Radius  $a$ , welche von einer Membran der Dicke  $h$  eingeschlossen wird, beschrieben. Trotz dieser stark vereinfachten Vorstellung hat sich herausgestellt, daß sich mit diesem Modell die Rotationsspektren von Erythrozyten und auch anderen Zellen recht gut beschreiben lassen [39,51,55].

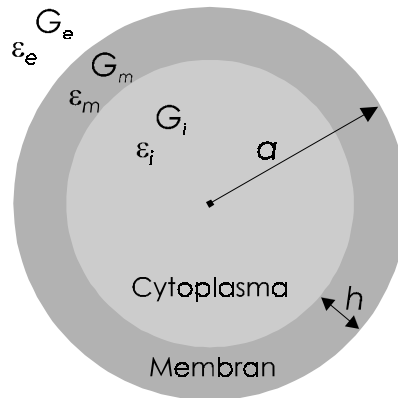


Bild 3.2: Modell einer einschaligen Zelle.  $G$ ,  $\epsilon$ ,  $a$  und  $h$  stehen jeweils für die Leitfähigkeit, die Dielektrizitätskonstante, den Zellradius und die Membrandicke. Die Indizes e, m und i markieren das äußere Medium, die Membran und den inneren Teil (Cytoplasma) der Zelle.

Für das Drehmoment in einem rotierenden elektrischen Feld folgt aus der Lösung der Gleichungen (3.3) bis (3.6) und Einsetzen in Gleichung (3.1):

$$N = 4\pi\epsilon_o\epsilon_e a^3 E^2 \left[ -\text{Im} \left( \frac{\alpha_{12}\beta_{23} + \alpha_{32}\beta_{12}\rho}{\alpha_{12}\alpha_{23} + 2\beta_{12}\beta_{23}\rho} \right) \right]\tag{3.7}$$



Die Koeffizienten repräsentieren Funktionen aus den einzelnen elektrischen und dielektrischen sowie den geometrischen Zellparametern (siehe Bild 3.2).

$$\begin{aligned}
 \alpha_{12} &= \varepsilon_o (\varepsilon_i + 2\varepsilon_m) - \frac{i}{\omega} (G_i + 2G_m) \\
 \alpha_{23} &= \varepsilon_o (\varepsilon_m + 2\varepsilon_e) - \frac{i}{\omega} (G_m + 2G_e) \\
 \alpha_{32} &= \varepsilon_o (\varepsilon_e + 2\varepsilon_m) - \frac{i}{\omega} (G_e + 2G_m) \\
 \beta_{12} &= \varepsilon_o (\varepsilon_i - \varepsilon_m) - \frac{i}{\omega} (G_i - G_m) \\
 \beta_{23} &= \varepsilon_o (\varepsilon_m - \varepsilon_e) - \frac{i}{\omega} (G_m - G_e)
 \end{aligned} \tag{3.8}$$

$$\rho = \left( \frac{a-h}{a} \right)^3 \tag{3.9}$$

$\varepsilon_o$  ist die elektrische Feldkonstante.

Prinzipiell lassen sich die Gleichungen für beliebig viele Zonen  $n$  lösen. Weitere Modelle, welche sich in der Vergangenheit bewährt haben, gehen von zwei oder drei Zonen aus. Diese haben insbesondere bei der Untersuchung von Protoplasten mit einer Vakuole oder bei Zellen, die einen großen Nukleus enthalten, Verwendung gefunden [48,49,55,82]. In anderen Modellen werden z.B. Inhomogenitäten des elektrischen Feldes oder komplexere Zellformen berücksichtigt [50,82]. Im folgenden Abschnitt wird das kubisch strukturierte Modell beschrieben [32,37], welches eine Möglichkeit darstellt die innere Struktur von bestimmten Zellen zu berücksichtigen.

### 3.1.2 Das kubisch strukturierte Modell

Da biologische oder auch kolloide Systeme häufig eine innere Struktur haben, reicht das Einschalen Modell zur Beschreibung von Elektrorotationsdaten häufig nicht mehr aus. Mit dem kubisch strukturierten Modell werden Partikel erfaßt, die im Inneren eine größere Anzahl von kleineren Partikeln enthalten [32]. Vereinfachend wird diese Innenstruktur durch kubisch gepackte Quader berücksichtigt (Bild 3.3). Jeder Quader hat eine innere Phase, die vom Äußeren durch eine dünne Membran getrennt wird. Im Bild 3.3 ist neben der Anordnung der Quader zueinander das Ersatzschaltbild eines einzelnen bei der angegebenen Feldrichtung aufgezeichnet.

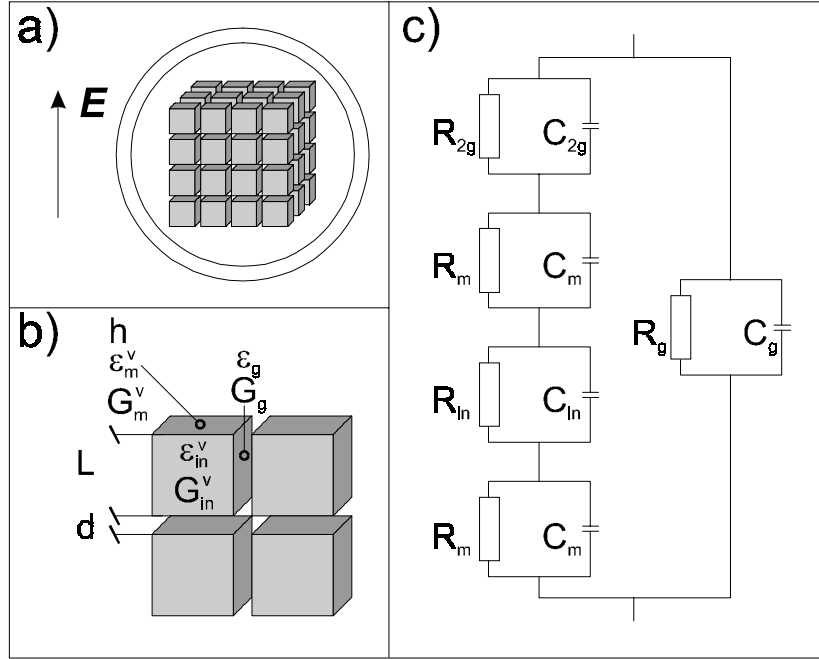


Bild 3.3: Schematische Darstellung des kubisch strukturierten Modells: a) Zelle mit kubischer Innenstruktur in elektrischem Feld  $E$ , b) Parameter der quaderförmigen Vesikel, c) Ersatzschaltbild eines einzelnen Quaders.

Das im folgenden beschriebene Modell wurde gegenüber dem ursprünglichen [32,37] etwas verändert, um es auf beliebige Verhältnisse zwischen dem Vesikeldurchmesser  $L$  und dem Vesikelabstand  $h$  zu erweitern. Die einzelnen Widerstände und Kapazitäten hängen wie folgt mit den Parametern der kubischen Vesikel zusammen:

$$C_m = \epsilon_m^v \frac{L^2}{h}$$

$$R_m = \frac{h}{G_m^v L^2}$$
(3.10)

$$C_{in} = \epsilon_{in}^v L$$

$$R_{in} = \frac{1}{G_{in}^v L}$$
(3.11)

$$C_g = \epsilon_g \frac{2Ld + d^2}{L + d}$$

$$R_g = \frac{L + d}{G_g (2Ld + d^2)}$$
(3.12)

$$C_{2g} = \epsilon_g \frac{L^2}{d}$$

$$R_{2g} = \frac{d}{G_g L^2} \quad (3.13)$$

Die gesamte Admittanz des Ersatzschaltbildes für die einzelnen Zellen ergibt sich aus der Summe der Admittanz des Spaltes  $A_g$  und der kubischen Zelle  $A_z$ :

$$A = A_g + A_z \quad (3.14)$$

Die Admittanz des Spaltes als Funktion der Winkelgeschwindigkeit wird durch die komplexe Funktion

$$A_g = \frac{1}{R_g} + i\omega G_g \quad (3.15)$$

wieder gegeben. Um die Admittanz der Zelle zu erhalten, müssen die vier Widerstände in Reihe geschaltet werden:

$$A_z = \frac{1}{\frac{2}{\frac{1}{R_m} + i\omega C_m} + \frac{1}{\frac{1}{R_{in}} + i\omega C_{in}} + \frac{1}{\frac{1}{R_{2g}} + i\omega C_{2g}}} \quad (3.16)$$

Aus der Summe der beiden Admittanzen lassen sich der effektive Widerstand  $R_{ef}$  und somit die effektive Leitfähigkeit  $G_{ef}$  sowie die effektive Kapazität  $C_{ef}$  und daraus die effektive Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_{ef}$  der kubischen Vesikel berechnen.

$$C_{ef} = \frac{\text{Im } A}{\omega} \quad (3.17)$$

$$R_{ef} = \frac{1}{\text{Re } A} \quad (3.18)$$

$$G_{ef} = \frac{1}{R_{ef}(L+d)} \quad (3.19)$$

$$\epsilon_{ef} = \frac{C_{ef}}{L+d} \quad (3.20)$$

Um im Einschalen-Modell die innere Struktur erfassen zu können, müssen die Parameter für die innere Leitfähigkeit  $G_i$  und die innere Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_i$  gegen die effektiven Funktionen  $G_{ef}$  und  $\epsilon_{ef}$  ausgetauscht werden.

### 3.1.3 Alpha – Dispersion

Die Theorie der niederfrequenten Elektrorotation ist relativ komplex [58]. Zunächst soll ein eher qualitatives Bild geschaffen werden, um den Mechanismus der Konzentrationspolarisation sowie die Natur der elektroosmotischen Komponente der Rotation des Partikels zu verdeutlichen.

Im Bild 3.4a wird die Konzentrationspolarisation illustriert. Es wird eine negative und immobile Oberflächenladung angenommen. Das äußere Feld bewirkt eine Wanderung der Kationen durch die elektrische Doppelschicht des Partikels. Dies führt an einer Seite des Partikels zu einem Überschuss an Kationen und an der gegenüberliegenden zu einer Verminderung. In der Nähe der Oberfläche des Partikels führt dies durch Elektrodifusion von Anionen zu Abweichungen der Elektrolytkonzentration relativ zum Wert, der in der Lösung herrscht. Die Folge ist, wie im Bild 3.4a dargestellt, die Kompression der Doppelschicht an der oberen Hälfte durch die Zunahme der Elektrolytkonzentration. Außerdem vergrößert sich die Ausdehnung der Doppelschicht an der gegenüberliegenden Seite des Partikels durch eine Abnahme der Elektrolytkonzentration. Die Differenz der Kationenkonzentration  $\Delta C$  gegenüber dem Zustand ohne Feld wird ebenfalls im Bild 3.4a dargestellt.

In Bild 3.4b wird die Verteilung der Ionen um das Partikel im Gleichgewicht ohne Einwirkung eines elektrischen Feldes dargestellt. Die Verteilung ist symmetrisch und kann daher zu keiner Rotationsbewegung durch Wechselwirkung mit dem Feld führen. Um die Abweichung der Ionenverteilung durch die Einwirkung des Feldes vom Gleichgewicht zu finden, kann nun die Gleichgewichtsverteilung von jener, die im Feld induziert wird, abgezogen werden. Im Bild 3.4c ist die Abweichung bzw. die Komponente aus Bild 3.4a ohne den Gleichgewichtsanteil zu sehen. Am oberen und am unteren Teil des Partikels (relativ zur Z-Achse aus Bild 3.4a) erkennt man eine Aufspaltung der Debye – Atmosphäre in jeweils zwei Schalen mit entgegengesetzten Ladungen.

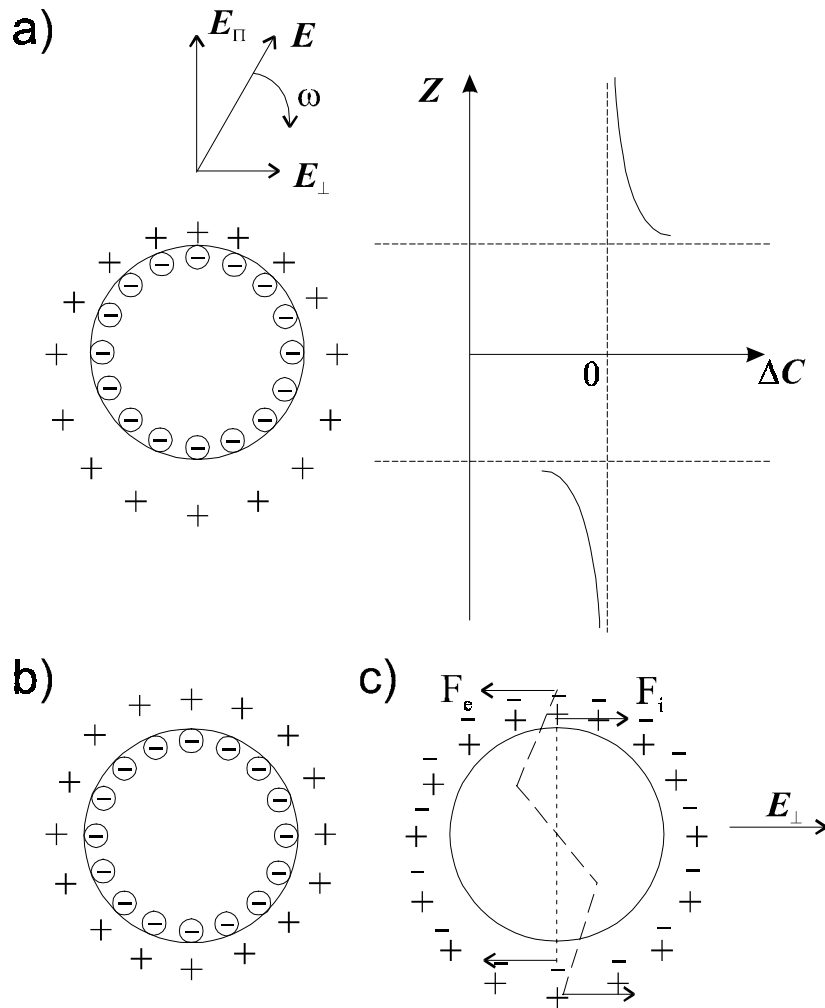


Bild 3.4: Schematische Darstellung der Ladungs- und Konzentrationsvariationen eines negativ geladenen Partikels in einem rotierendem elektrischem Feld. a) Ladungsverteilung um das Partikel bei Einwirkung eines rotierenden elektrischen Feldes sowie die qualitativen Differenzen der Kationenkonzentration  $\Delta C$  gegenüber dem Ruhezustand.  $Z$  bezeichnet hier die Achse, die in Phase mit den erzeugten Konzentrationsvariationen ist. Der Feldvektor  $E$  mit der Kreisfrequenz  $\omega$  lässt sich in eine parallele Komponente  $E_{||}$  und eine orthogonale Komponente  $E_{\perp}$  zerlegen. b) Ladungsverteilung ohne Einwirkung eines elektrischen Feldes. c) Abweichung der Ladungsverteilung vom Gleichgewichtszustand.  $F_e$  und  $F_i$  stellen die zwei elektroosmotischen Kräfte, die das Drehmoment erzeugen, dar.

Der elektrische Feldvektor läßt sich in zwei Komponenten teilen, wobei die eine in Phase mit den Änderungen der Konzentration ist  $E_{||}$  und die andere orthogonal zu dieser steht  $E_{\perp}$  (Bild 3.4a). Wie im Bild 3.4c zu erkennen ist, greift an der aufgespalteten Ladungsverteilung die orthogonale Feldkomponente  $E_{\perp}$  an. Es werden zwei entgegengesetzte aber gleich große Kräfte erzeugt,  $F_e$  und  $F_i$ , die auf die räumlichen Ladungsverteilungen wirken und so einen elektroosmotischen Schlupf erzeugen. Außerdem wirkt auf das gesamte System, d.h. auf das Partikel und die Debye-Atmosphäre noch ein Drehmoment entgegen der Feldrichtung, hervorgerufen durch die Wechselwirkung des induzierten Dipolmomentes mit dem externen Feld.

Im folgenden wird die Größe sowie die Richtung des elektroosmotisch erzeugten Drehmomentes mit dem durch das induzierte Dipolmoment hervorgerufene Drehmoment verglichen. Das induzierte Dipolmoment führt zum Drehmoment  $N_d$ :

$$N_d = Q\delta E_{\perp} \quad (3.21)$$

$Q$  steht für die absolute Ladung des Partikels im Gleichgewicht, also ohne Einfluß durch äußere elektrische Felder.  $\delta$  ist die Variation der Dicke der Doppelschicht im elektrischen Feld. Unter der Annahme einer Stokeschen Reibung (Gleichung (3.2)) folgt für die vom Dipolmoment hervorgerufene Gegenfeldrotation die Rotationsgeschwindigkeit  $\omega_d$ :

$$\omega_d = \frac{Q\delta E_{\perp}}{8\pi\eta a^3} \quad (3.22)$$

Hier steht  $a$  für den Partikelradius und  $\eta$  für die Viskosität der Lösung, in der sich der Partikel befindet.

Die Größe der beiden elektroosmotischen Drehmomente  $N_e$  und  $N_i$  lautet

$$N_e = Q(a + \delta)E_{\perp} \quad (3.23)$$

$$N_i = QaE_{\perp} \quad (3.24)$$

Diese beiden entgegengesetzten Drehmomente kann man sich so vorstellen, daß sie an zwei verschiedenen Schalen ansetzen, wobei eine den Radius  $a$  und eine den Radius  $a + \delta$  hat. Somit erhält man für die Roationsgeschwindigkeit  $\omega_{osm}$ :

$$\omega_{osm} = \omega_i - \omega_e = \frac{QE_{\perp}}{8\pi\eta a^3} \left[ \frac{1}{a^2} - \frac{1}{(a + \delta)^2} \right] \quad (3.25)$$

Wenn man noch berücksichtigt, daß  $\delta \ll a$  ist, folgt

$$\omega_{osm} = \frac{2Q\delta E_{\perp}}{8\pi\eta a^3} \quad (3.26)$$

Diese Abschätzung zeigt, daß die elektroosmotische Komponente der Rotationsgeschwindigkeit größer ist als die, die durch die Wechselwirkung zwischen dem induzierten Dipol und dem rotierenden Feld entsteht, solange die Bedingung  $\delta \ll a$  erfüllt ist.

Im folgenden wird das Resultat der Theorie zur Elektrorotation im niederfrequenten Bereich nach Grosse und Shilov [58] wiedergegeben. Den Ausgangspunkt für diese Theorie stellt das sogenannte Standardmodell der elektrischen Doppelschicht dar. Nach diesem Modell wird ein gelöstes Partikel durch eine isolierende Sphäre mit einem Radius  $a$  und einer gleichmäßigen Oberflächenladung  $\sigma$  beschrieben. Der umgebende Elektrolyt hat eine Viskosität  $\eta$  und eine Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_e$ . Die Lösung soll aus zwei Ionensorten bestehen mit den Diffusionskonstanten  $D^{\pm}$ , den identischen Wertigkeiten  $z^+ = z^- = z$  und daher auf Grund der Elektroneutralität auch mit den gleichen Konzentrationen weit entfernt vom Partikel  $c^{+(\infty)} = c^{-(\infty)} = c$ . Unter diesen Voraussetzungen wird der Debye-Hückel-Parameter  $\chi$  (die inverse Debye-Länge  $l_D$ ) und das  $\zeta$ -Potential zu:

$$\chi = \sqrt{\frac{2e_o^2 N_L z^2 c}{\epsilon_e \epsilon_o kT}} \quad (3.27)$$

$$\zeta = \frac{2kT}{ze_o} \sinh^{-1} \left( \frac{\sigma \chi}{4N_L e_o c} \right) \quad (3.28)$$

$N_L$ ,  $e_o$ ,  $k$  und  $T$  stehen jeweils für die Loschmidt-Konstante, die Elementarladung, die Boltzmann-Konstante und die Temperatur.

Als Resultat für die Elektrorotationsgeschwindigkeit folgt:

$$\omega = -\frac{\epsilon_e E^2}{2\eta} \left[ H + \frac{1}{z} \tanh \left[ \frac{z\zeta e_o}{2kT} \right] (1 - K_{d\infty}) \right] \frac{3z(R^+ - R^-)AW^2(W+1)}{2(W^2(AW+B)^2 + B^2(W+1)^2)} \quad (3.29)$$

Die beiden Summanden in der Klammer bestimmen die Anteile an der Rotationsgeschwindigkeit durch die beiden berücksichtigten Mechanismen. Der erste Summand  $H$  gibt den Anteil der Rotation durch die Dipol-Feld-Wechselwirkung wieder.  $H$  ist eine komplexe Funktion vom  $\zeta$ -Potential, den Diffusionskonstanten, den Ionenwertigkeiten und der Debye-Länge. Der zweite Term beschreibt den Anteil der Elektroosmose an der Rotation.

Im folgenden werden die einzelnen Koeffizienten und Funktionen zur Gleichung wiedergegeben.  $D_{ef}$  und  $\Delta$  sind zwei durch die Diffusionskonstanten und die Ionenwertigkeiten definierte Größen:

$$\Delta = \frac{D^- - D^+}{D^+ z + D^- z} \quad (3.30)$$

$$D_{ef} = \frac{2D^+ D^-}{D^+ + D^-} \quad (3.31)$$

$G_0^\pm$  ist jeweils der Adsorptionskoeffizient für die beiden Ionen

$$G_0^\pm = \frac{2zc}{\chi} \left[ e^{\mp \frac{z\zeta e_0}{2kT}} - 1 \right] \quad (3.32)$$

$W$  ist die durch die charakteristische Diffusionszeit skalierte dimensionslose Wurzel der Feldfrequenz

$$W = \left[ \frac{\omega a^2}{2D_{ef}} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.33)$$

Die übrigen Parameter sind mehr oder wenig komplexe Funktionen vom  $\zeta$ -Potential, den Diffusionskonstanten, den Ionenwertigkeiten und der Debye-Länge:

$$H = \frac{(R^+ - R^-)(1 - z^2 \Delta^2) - U^+ + U^- + z\Delta(U^+ + U^-)}{zA} \quad (3.34)$$

$$K_{d\infty} = \frac{R^+ + R^- - 2 - z\Delta(R^+ + R^-)}{R^+ + R^- + 4 - z\Delta(R^+ + R^-)} \quad (3.35)$$

$$B = (R^+ + 2)(R^- + 2) - U^+ - U^- - \frac{(U^+ R^- + U^- R^+)}{2} \quad (3.36)$$

$$A = R^+ + R^- + 4 - z\Delta(R^+ - R^-) \quad (3.37)$$



$$U^{\pm} = \frac{48m^{\pm}}{\chi a} \ln \left[ \cosh \frac{z\zeta e_o}{4kT} \right] \quad (3.38)$$

$$R^{\pm} = \frac{2G_0^{\pm}}{zaN_L} + 6m^{\pm} \left[ \frac{G_0^{\pm}}{zaN_L} \pm \frac{z\zeta e_o}{\chi a kT} \right] \quad (3.39)$$

$$m^{\pm} = \frac{2\varepsilon_e}{3\eta D^{\pm}} \left[ \frac{kT}{ze_o} \right]^2 \quad (3.40)$$

Grosse und Shilov konnten zeigen, daß der Dipolanteil und der elektroosmotische Anteil an der Elektrorotation immer entgegengesetzt zueinander sind. Für niedrige Werte des  $\zeta$ -Potentials überwiegt der elektroosmotische Anteil und die resultierende Rotation erfolgt in Feldrichtung. Bei größeren  $\zeta$ -Potential wird der elektroosmotische Beitrag zur Rotation im Verhältnis zur Dipol-Feld Wechselwirkung klein und es resultiert eine Rotation entgegen der Feldrichtung (Bild 3.5).

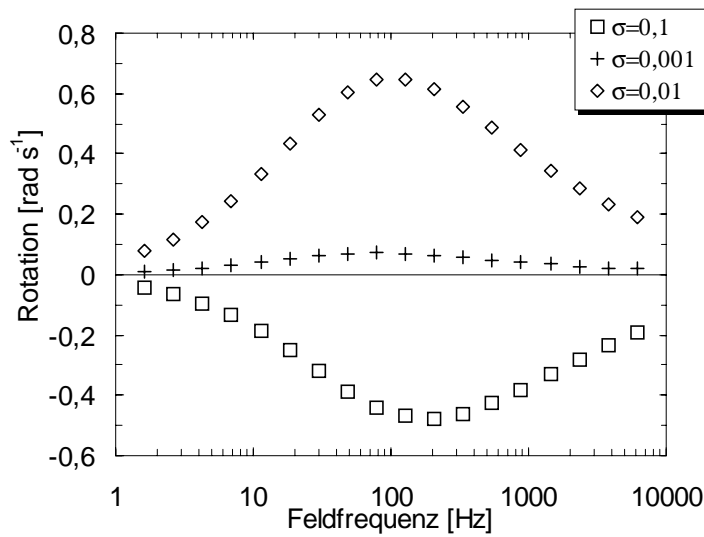


Bild 3.5: Theoretische Elektrorotationsspektren im  $\alpha$ -Dispersionsbereich mit unterschiedlichen Oberflächenladungen ( $\sigma$ , Angaben in  $\text{C/m}^2$ ) in KCl Lösung (Leitfähigkeit  $1\text{mS/m}$ , Partikelradius  $4\mu\text{m}$ , Feldstärke  $5000\text{V/m}$ ).

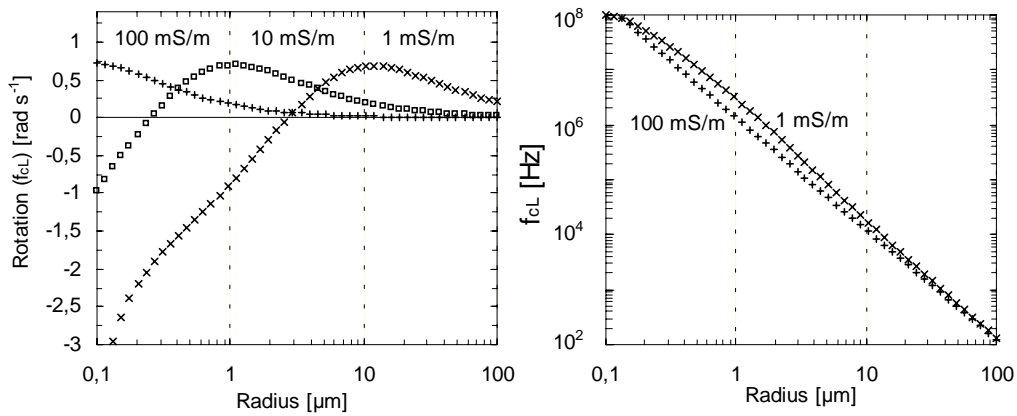


Bild 3.6: Theoretische Abhängigkeit der Rotationsgeschwindigkeit und der Position ( $f_{cL}$ ) des Maximums vom Partikelradius bei verschiedenen Leitfähigkeiten in KCl Lösung bei 5000V/m und  $\sigma_o=0,04\text{C/m}^2$ .

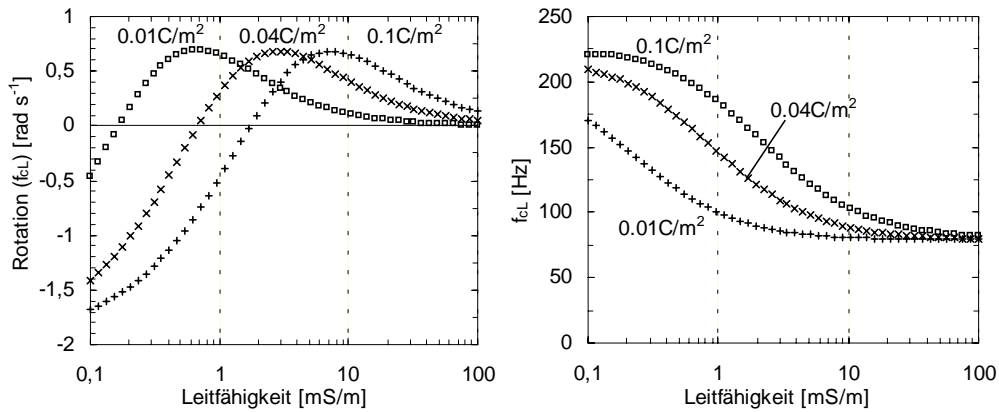


Bild 3.7: Theoretische Abhängigkeit der Rotationsgeschwindigkeit und der Position ( $f_{cL}$ ) des Maximums von der Leitfähigkeit bei verschiedenen Oberflächenladungen in KCl Lösung bei 5000V/m und einem Partikelradius von  $4\mu\text{m}$ .

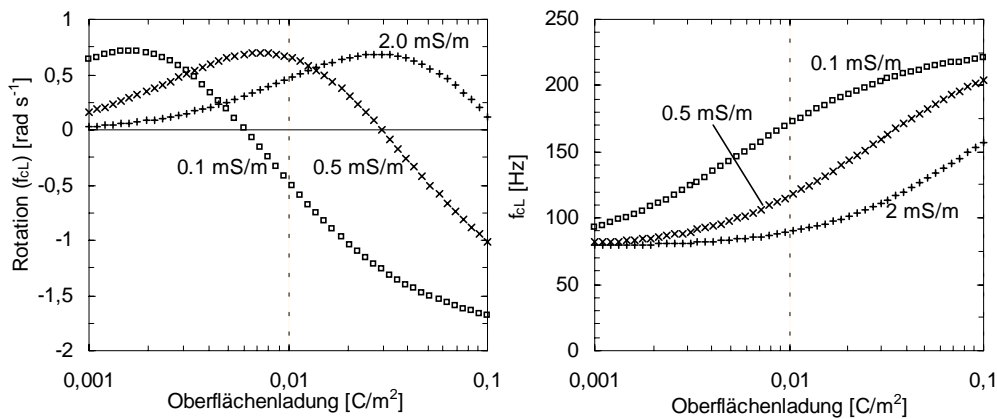


Bild 3.8 Theoretische Abhängigkeit der Rotationsgeschwindigkeit und der Position ( $f_{cL}$ ) des Maximums von der Oberflächenladungsdichte bei verschiedenen Leitfähigkeiten in KCl Lösung bei 5000V/m und einem Partikelradius von  $4\mu\text{m}$ .

Im Bild 3.6 bis Bild 3.8 werden zur Veranschaulichung der Auswirkung der  $\alpha$ -Dispersion die Abhängigkeiten der Frequenz maximaler Rotation  $f_{cL}$  und der Rotationsgeschwindigkeit  $R_{cL}$  bei dieser Frequenz von den Parametern Radius, Oberflächenladung sowie Leitfähigkeit dargestellt. Bezüglich  $f_{cL}$  fällt im Bild 3.6 auf, daß sie umgekehrt proportional zum Partikelradius ist. Dies liegt an der Proportionalität der charakteristischen Diffusionszeit zum Kehrwert des Partikelradius, da  $f_{cL}$  im wesentlichen durch diese bestimmt wird. Entsprechend gering fällt der Einfluß von der Leitfähigkeit und der Oberflächenladung auf  $f_{cL}$  aus (Bild 3.7 und Bild 3.8). Die Richtung der Partikelrotation hängt davon ab, ob die Dipol-Feld-Wechselwirkung oder der elektroosmotische Beitrag überwiegt. Die Dipol-Feld-Wechselwirkung führt immer zu einer Rotation antiparallel zur Feldrichtung und der elektroosmotische Beitrag immer zu einer Rotation parallel zu Feldrichtung [58]. Für kleine  $\zeta$ -Potentiale überwiegt der elektroosmotische Anteil und für große  $\zeta$ -Potentiale wird er vernachlässigbar [58]. Die Abhängigkeiten der Partikelrotation im Bild 3.7 und im Bild 3.8 spiegeln daher im wesentlichen wieder, daß das  $\zeta$ -Potential mit zunehmender Ladung und mit abnehmender Leitfähigkeit ansteigt

## 3.2 Elektrophorese

Theoretische Ansätze zur Berechnung der elektrophoretischen Mobilität von Partikeln unterscheiden zwischen haarigen und glatten Oberflächen. Bei Konzepten zur Beschreibung von Partikeln mit haarigen Oberflächen wird berücksichtigt, daß auch unterhalb der äußeren Grenze der haarigen Schicht ein konvektiver Fluß auftritt. Entsprechend unterscheiden sich auch die elektrophoretischen Mobilitäten von Partikeln in Polymerlösungen, in denen sich eine Depletionschicht ausbildet in Abhängigkeit von der Oberflächenstruktur.

Im folgenden soll ein spezielles Modell zur Beschreibung der elektrophoretischen Mobilität bei vorhandener Depletionschicht an einer glatten Oberfläche also ohne einen elektroosmotischen Fluß durch die geladene Oberfläche beschrieben werden[10]. In dem nach Smoluchowski vereinfachten Fall eines großen glatten Partikels hängt das  $\zeta$ -Potential wie folgt von der Mobilität  $\mu$  ab:

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\varepsilon_e \varepsilon_0} \quad (3.41)$$

Für glatte Oberflächen kann aus dem  $\zeta$ -Potential nach der Gouy-Chapmann Gleichung die Oberflächenladung  $\sigma$  berechnet werden:

$$\sigma = \frac{2\varepsilon_e \varepsilon_0 \chi kT}{e_o} \sinh \frac{e_o \zeta}{2kT} \quad (3.42)$$

Wenn man nun von dem nach Smoluchowski vereinfachten Fall eines glatten großen Partikels ausgeht wird die Navier-Stokes Gleichung, die das elektroosmotischen Geschwindigkeitsprofil  $v(x)$  senkrecht zur Oberfläche des Partikels beschreibt, unter Berücksichtigung der ortsabhängigen Viskosität  $\eta(x)$ , zu:

$$-E\rho(x) = \frac{d}{dx} \left[ \eta(x) \frac{d}{dx} v(x) \right] \quad (3.43)$$

Hierbei ist  $x$  die Abstandskoordinate parallel zur Oberfläche (mit dem Ursprung auf dieser),  $E$  die elektrische Feldstärke und  $\rho(x)$  die räumliche Ladungsverteilung. Die Randbedingungen für das elektroosmotische Profil sind

$$\begin{aligned} v(\infty) &= \text{begrenzt} \\ v(x_0) &= 0 \end{aligned} \quad (3.44)$$

$x_0$  ist die Position der Scherebene. Um die elektrophoretische Mobilität  $\mu$  zu berechnen wird die Poisson Gleichung

$$\frac{d^2}{dx^2} \Psi(x) = -\frac{\rho(x)}{\varepsilon \varepsilon_0} \quad (3.45)$$

in Gleichung (3.43) eingesetzt und integriert.  $\Psi(x)$  ist das elektrische Potential,  $\varepsilon$  die Permittivitätszahl und  $\varepsilon_0$  die elektrische Feldkonstante.

$$\mu = -\frac{v(\infty)}{E} = -\varepsilon \varepsilon_0 \int_{\Psi(x_0)}^0 \frac{d\Psi}{\eta(x)} \quad (3.46)$$

$\Psi(x_0)$  entspricht dem  $\zeta$  - Potential. Falls eine Depletionschicht durch Makromoleküle vorhanden ist, wird die Viskosität kleiner als in der Lösung sein. Die Größe der Mobilität hängt dann insbesondere vom Ausmaß des Überlapp der Depletion- und der Doppelschicht ab. Ein möglicher Lösungsansatz ist die Annahme eines exponentiellen

Viskositätsprofils [97] als Annäherung an das Viskositätsverhalten nahe der Oberfläche des Partikels [7]:

$$\eta(x) = \frac{\eta_P}{1 + \left( \frac{\eta_P}{\eta_0} - 1 \right) e^{-\frac{x}{\lambda}}} \quad (3.47)$$

$\eta_P$  und  $\eta_S$  sind jeweils die Viskosität in der Lösung und an der Partikeloberfläche  $x_0$ .  $\lambda$  steht als Parameter für die effektive Dicke der Depletionschicht.

Mit dem exponentiellen Ansatz für die Viskosität (Gleichung (3.47)) ist es möglich, eine analytische Lösung der Navier-Stokes Gleichung zusammen mit der linearisierten Poisson-Boltzmann Gleichung zu erhalten. Diese vereinfachte theoretische Behandlung ermöglichte eine quantitative Interpretation des Verhaltens von Erythrozyten in der Anwesenheit von Dextran [10].

Wenn die Depletionschicht groß ist im Verhältnis zur Dicke der Doppelschicht, erhält man durch weitere Linearisierung [7]:

$$\frac{\mu_S}{\mu_P} = \frac{\eta_0}{\eta_S} \left[ 1 + \left( 1 - \frac{\eta_0}{\eta_P} \right) \frac{1}{\chi\lambda} \right] \quad (3.48)$$

Hier stehen  $\mu_s$  und  $\mu_p$  jeweils für die Mobilität in Abwesenheit und in Anwesenheit von Polymeren.  $\eta_s$  ist die Viskosität des Lösungsmittels. Gleichung (3.48) wird im Kapitel 5 zur Bestimmung von  $\lambda$  sowie der Viskosität  $\eta_0$  an der Grenzfläche verwendet werden.

Abschließend sollen noch einmal die Konsequenzen einer Polymerdepletionschicht auf die elektrophoretische Mobilität und die sich daraus ergebenden Möglichkeiten verdeutlicht werden.

Als ein Resultat der geringeren Viskosität in der Depletionschicht überschreitet die elektrophoretische Mobilität die nach Smouluchowskis Gleichung vorhergesagte. Dieser Unterschied kann sehr groß werden. Wenn die Debye-Länge zunimmt bzw. bei Ionenstärke abnimmt, nähert sich das theoretische Verhältnis der Partikel-Mobilitäten im Lösungsmittel und der Polymerlösung  $\mu_s/\mu_p$  allmählich dem umgekehrten Verhältnis der Viskositäten  $\eta_p/\eta_s$ . Dieser Sachverhalt resultiert aus der Ausdehnung der Doppelschicht in den Bereich außerhalb der Depletionschicht mit der entsprechend höheren Viskosität. In Gleichung (3.47) äußert sich dieser Zusammenhang darin, daß

für größer werdende Oberflächenabstände die Viskosität gegen den Wert der Polymerlösung  $\eta_p$  läuft.

In dem Falle, in dem ein Mobilitätsverhältnis  $\mu_s/\mu_p$ , beobachtet wird, welches kleiner ist als das Viskositätsverhältnis,  $\eta_p/\eta_s$ , kann man folglich von einer Depletionschicht ausgehen. Die umgekehrte Situation, wenn  $\mu_s/\mu_p$  größer als das Viskositätsverhältnis ist, läßt sich ebenfalls beobachten. Dies kann durch Polymere nahe der Grenzfläche hervorgerufen werden, welche eine zusätzliche hydrodynamische Abschirmung der Oberflächenladungen verursachen, z.B. durch Polymeradsorption.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität von Partikeln in Abhängigkeit von der Ionenstärke in Anwesenheit und in Abwesenheit von Polymeren eine Untersuchungsmethode darstellt. Sie gibt Aufschluß über das Verhalten von Polymeren an der Grenzfläche zwischen Zelle und Lösung.

## 4 Elektrorotation im Niederfrequenzbereich

In diesem Kapitel werden experimentelle Ergebnisse zur Elektrorotation im  $\alpha$ -Dispersionsgebiet vorgestellt und mit dem theoretischen Modell von Grosse und Shilov [58] verglichen. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Elektrorotation von Glutaraldehyd fixierten Erythrozyten im niederfrequenten Bereich (Kapitel 4.1). Im darauffolgenden Teil (Kapitel 4.2) werden Elektrorotationsspektren von Formaldehyd fixierten Thrombozyten unter Berücksichtigung des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Dispersionsgebietes diskutiert. Im abschließenden Kapitel 4.3 werden dann die gewonnenen Resultate noch einmal zusammengefaßt.

### 4.1 Fixierte Erythrozyten

Bei den Untersuchungen zur  $\alpha$ -Dispersion wurden Erythrozyten verwendet, die zuvor mit Glutaraldehyd fixiert wurden (GA-fixiert). Durch die Fixierung mit Glutaraldehyd werden zum größten Teil die positiven Aminogruppen von der Oberfläche entfernt, was zu einem hohen negativen  $\zeta$ -Potential auch bei niedrigen Ionenstärken führt [27]. Weiterhin zerstört das Glutaraldehyd die Lipidmembran und vernetzt die Proteine [60]. Die Folge ist ein stabiles Partikel, welches im Gegensatz zu nativen Erythrozyten nicht mehr hämolysieren kann und dessen Struktur und Aufbau weitestgehend bekannt ist. Durch die Behandlung der Erythrozyten mit Neuraminidase vor der GA-Fixierung läßt sich außerdem die Oberflächenladung reduzieren, ohne andere Zellparameter zu beeinflussen [77,81]. Eine Gegebenheit, welche die GA-fixierten Erythrozyten als Modellpartikel mit sich bringen, ist die Verteilung der Oberflächenladungen in einer Schicht, die einige Nanometer dick ist. Im Standardmodell einer elektrischen Doppelschicht, welches auch Ausgangspunkt für die Theorie zur Elektrorotation im  $\alpha$ -Dispersionsgebiet ist (Kapitel 3.1.3), wird von einer zweidimensionalen Ladungsverteilung ausgegangen.

Im Bild 4.1 ist ein Vergleich zwischen Elektrorotationsspektren von GA-fixierten und nativen Erythrozyten bei ähnlichen externen Leitfähigkeiten zu sehen. Das Spektrum der GA-fixierten Erythrozyten wurde bei einer Leitfähigkeit von 2,0 mS/m und das der

nativen bei 2,6 mS/m aufgenommen. Da für die Messung der nativen Erythrozyten die geringe Ionenstärke durch Zugabe von Saccharose ausgeglichen wurde, ist die Viskosität um einen Faktor 1,22 höher. Die Feldstärke die bei den GA-fixierten Zellen angelegt wurde, war doppelt so hoch. Dies ist insofern von Bedeutung, da das Drehmoment, welches auf das induzierte Dipolmoment wirkt, proportional zum Quadrat der Feldstärke ist.

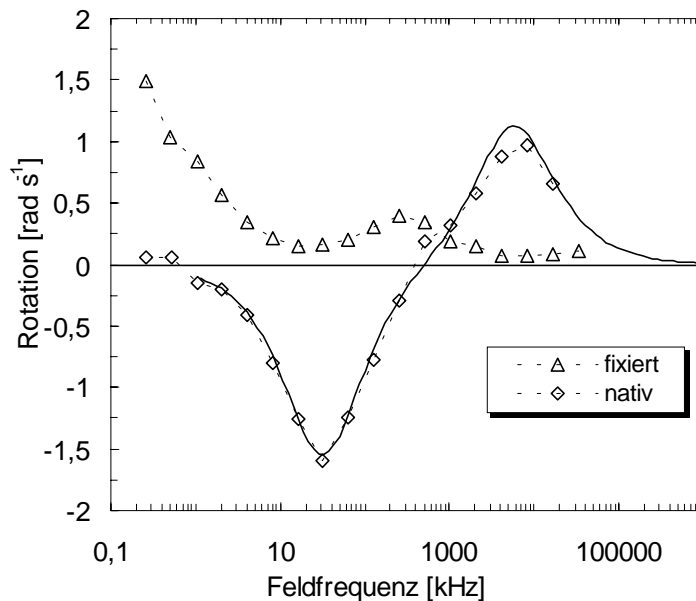


Bild 4.1: Vergleich des Elektrorotationsspektrum von nativen Erythrozyten mit dem von GA-fixierten Erythrozyten zwischen 260 Hz und 16 MHz. Das Spektrum der nativen Erythrozyten wurde in isotoner gepufferter NaCl-Lösung mit Sacharose bei einer Leitfähigkeit von 2,6 mS/m und einer Feldstärke von  $7,5 \cdot 10^3$  V/m aufgenommen. Das Spektrum der GA-fixierten Erythrozyten wurde in gepufferter NaCl-Lösung bei einer Leitfähigkeit von 2,0 mS/m und einer Feldstärke von  $15 \cdot 10^3$  V/m aufgenommen. Die durchgezogene Linie ist ein theoretisches Spektrum (unabhängig von der Feldstärke und Viskosität) für die nativen Zellen unter Verwendung des Einschalen Modells (s.a.: Kp.3.1.1) mit folgenden Parametern:  $\epsilon_i = 50$ ,  $\epsilon_m = 6$ ,  $\epsilon_e = 80$ ,  $G_i = 60$  mS/m,  $G_m = 0.01$   $\mu$ S/m,  $h = 8$  nm und  $R = 3.3$   $\mu$ m.

Die nativen Zellen zeigen oberhalb von 1 kHz ein Rotationsverhalten, wie es bei niedrigen Ionenstärken auch für andere biologische Zellen beobachtet wird [39,82]. Bei 1 kHz beginnend steigt zunächst die Rotationsgeschwindigkeit entgegen der Feldrichtung an, bis sie ein Maximum noch unterhalb von 1 MHz erreicht. Anschließend kehrt sich die Rotation um und läuft oberhalb von 1 MHz abermals in ein Maximum. Unterhalb von 1 kHz zeigen die nativen Erythrozyten eine geringe Rotation parallel zur Feldrotation.



Mit dem Einschalen Modell wurde ein theoretisches Spektrum für den Verlauf oberhalb von 1 kHz berechnet (durchgezogene Linie im Bild 4.1). Für dieses theoretische Spektrum mußte eine innere Leitfähigkeit der Erythrozyten von 60 mS/m angenommen werden. Elektrorotationsmessungen von Erythrozyten bei physiologischen Ionenstärken ergeben hingegen eine Leitfähigkeit des Cytoplasmas von 0,4 S/m [56]. Diesbezüglich erscheint der Wert zunächst recht gering. Auf Grund der geringen Leitfähigkeit in der das Spektrum aufgenommen wurde, war diese Abnahme zu erwarten. Bei nativen Erythrozyten kann es zu einem Flux von Ionen aus der Zelle heraus kommen, wenn sie in Lösungen mit geringen Ionenstärken gebracht werden [35].

Die Rotation parallel zur Feldrichtung unterhalb von 1kHz läßt sich mit dem Einschalen Modell bzw. mit dem Konzept der  $\beta$ -Dispersion nicht erklären. Im Bild 4.2 sind zwei Elektrorotationsspektren von nativen Erythrozyten im Frequenzbereich zwischen 64Hz und 3kHz zu sehen. Die beiden Spektren wurden bei einer externen Leitfähigkeit von jeweils 3,2mS/m und 22,6mS/m aufgenommen. Mit abnehmender Feldfrequenz kehrt sich die Rotationsrichtung bei 1kHz um. Im weiteren Verlauf steigt die Rotationsgeschwindigkeit monoton bis zum letzten Meßwert bei 64Hz an, wobei dieser Anstieg bei niedriger Leitfähigkeit deutlich steiler ist. Die charakteristische Frequenz  $f_{01}$ , bei der sich die Rotationsrichtung umkehrt, weist keine Abhängigkeit von der Leitfähigkeit auf. Bei anderen Messungen von nativen Erythrozyten zwischen 2mS/m und 22,6mS/m wurde  $f_{01}$  immer im Bereich von 600Hz bis 1,2kHz bestimmt. Diese Variation von  $f_{01}$  konnte nicht den experimentellen Bedingungen zugeordnet werden. Ihr Ursprung wird wohl eher in der biologischen Vielfalt der Zellen liegen. So könnte zum Beispiel die Ursache dieser Bandbreite an leicht unterschiedliche Zellradien und -formen oder auch an Unterschieden der Oberflächenladungen und -strukturen liegen.

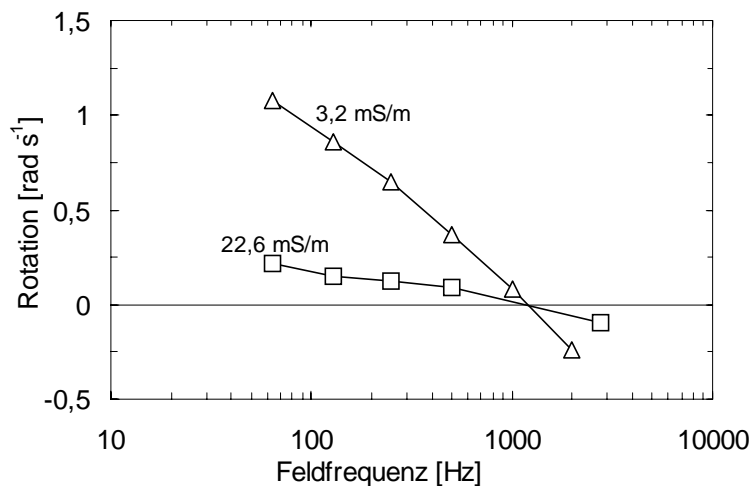


Bild 4.2: Elektrorotationsspektren im Bereich des ersten Nulldurchganges von nativen Erythrozyten der gleichen Population bei zwei verschiedenen externen Leitfähigkeiten. Bei den Spektren handelt es sich um Mittelwerte aus 2-4 Einzelwerten. Für Feldfrequenzen oberhalb von 100 Hz ist die absolute Varianz der Messpunkte  $<0,025$  rad/sec. Die Spektren wurden bei einer Feldstärke von  $13,8 \cdot 10^3$  V/m aufgenommen.

Das Spektrum der GA-fixierten Erythrozyten zeigt bei vergleichbarer externer Leitfähigkeit keine Gegenfeldrotation. Im Gegensatz zu den nativen Erythrozyten ist eine wesentlich ausgeprägtere Rotation mit dem Feld im Bereich niedriger Frequenzen zu erkennen. Das Rotationsmaximum zwischen 100 kHz und 1 MHz deutet darauf hin, daß auch hier eine Maxwell-Wagner Dispersion vorliegt. Diese ist jedoch geringer als bei den nativen Erythrozyten. Bevor weiter unten der  $\beta$ -Dispersionsbereich der GA-fixierten Erythrozyten näher beschrieben wird, soll zunächst auf die Elektrorotation im niederfrequenten Bereich eingegangen werden.

Im Bild 4.3 sind mehrere Elektrorotationsspektren im  $\alpha$ -Dispersionsgebiet von GA-fixierten Erythrozyten bei unterschiedlichen Leitfähigkeiten des Elektrolyten zu sehen. Die Leitfähigkeit wurde zwischen 1,0 mS/m und 18,5 mS/m variiert. Bei allen Leitfähigkeiten fällt auf, daß die Partikel eine maximale Rotationsgeschwindigkeit bei 50 Hz haben. Die Position des Maximums scheint nur sehr gering von der Leitfähigkeit abzuhängen. Die Rotationsrichtung ist parallel zur Feldrotation. Weiterhin erkennt man, daß die Rotationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der äußeren Leitfähigkeit ein Maximum bei 3,5 mS/m hat.

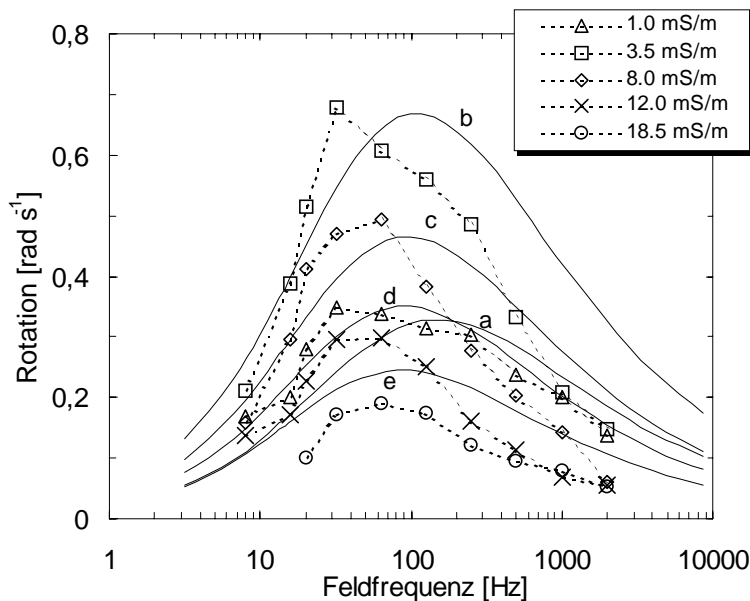


Bild 4.3: Vergleich theoretischer und experimenteller Elektrorotationsspektren von GA-fixierten Erythrozyten bei unterschiedlichen externen Leitfähigkeiten. Die Feldstärke betrug bei allen Messungen  $5 \cdot 10^3$  V/m. Die einzelnen Messpunkte repräsentieren jeweils einen Mittelwert der Rotationsgeschwindigkeit von 3 bis 8 einzelnen Zellen. Für die theoretischen Spektren, die durchgezogenen Linien, wurde eine Oberflächenladungsdichte von  $0,038 \text{ C/m}^2$  und ein Zellradius von  $3,92 \mu\text{m}$  angenommen. Die entsprechenden Leitfähigkeiten  $G_e$  sind: a=1,0 mS/m, b=3,5 mS/m, c=8,0 mS/m, d=12,0 mS/m und e=18,5 mS/m. Die mittleren Standardabweichungen betrugen 14-18%.

Die theoretischen Kurven im Bild 4.3 wurden mit dem Modell der Elektrorotation bei niedrigen Frequenzen (Kapitel 3.1.3) berechnet. Dabei wurde eine Oberflächenladung von  $0,038 \text{ C/m}^2$  und ein Erythrozytenradius von  $3,92 \mu\text{m}$  [53] angenommen. Die Konzentrationen des Elektrolyten, welche ebenfalls für die Berechnung der theoretischen Spektren benötigt werden, wurden aus den gemessenen Leitfähigkeiten und den Mobilitäten von Chlor- und Kaliumionen [25] abgeleitet. Die grundsätzliche Übereinstimmung zwischen den theoretischen und experimentellen Daten lässt sich gut erkennen. Sowohl die Geschwindigkeit und die Richtung der Zellrotation als auch die Abfolge der Maxima der Rotationsgeschwindigkeit zeigen eine gute Übereinstimmung. Dennoch liegen die Positionen der theoretischen Rotationsmaxima nicht genau bei der Feldfrequenz, bei der das experimentelle Maximum liegt (s.a. Tabelle 4.1). Bei allen gemessenen Leitfähigkeiten lässt sich eine systematische Verschiebung der theoretischen Daten hin zu höheren Frequenzen erkennen. Ein Vergleich der Rotationsgeschwindigkeiten in Bild 4.3 oberhalb einer Feldfrequenz von 100 Hz zeigt, daß sich das Spektrum der Rotationsgeschwindigkeit bei einer Leitfähigkeit von

1,0 mS/m, also der niedrigsten gemessenen Ionenstärke, zu größeren Frequenzen hin verbreitert. Bei den theoretischen Spektren scheint sich dieses Verhalten indirekt wiederzuspiegeln. Die theoretische Position des Maximums ist bei einer Leitfähigkeit von 1,0 mS/m bei einer Frequenz von 150 Hz zu finden, dagegen bewegt sich dieses bei höherer Ionenstärke zwischen 109 Hz und 88 Hz.

Tabelle 4.1: Experimentelle (ex) und theoretische (th) Werte zum Bild 4.3.  $R_{\text{cL}}$  und  $f_{\text{cL}}$  stehen jeweils für die maximale Rotationsgeschwindigkeit und die dazugehörige Feldfrequenz.

$G_{\text{e}}$ [mS/m]	<b>1,0</b>	<b>3,5</b>	<b>8,0</b>	<b>12,0</b>	<b>18,5</b>
$f_{\text{cL-ex}}$ [Hz]	43	49	48	52	71
$R_{\text{cL-ex}}$ [rad s <sup>-1</sup> ]	0,37	0,72	0,54	0,33	0,21
$f_{\text{cL-th}}$ [Hz]	150	109	95	90	88
$R_{\text{cL-th}}$ [rad s <sup>-1</sup> ]	0,33	0,67	0,47	0,35	0,25

Ein möglicher Grund für die beobachteten Abweichungen der experimentellen Daten von den theoretischen können die Vereinfachungen sein, die in dem theoretischen Modell angenommen werden. Insbesondere sollte in diesem Zusammenhang nochmals darauf hingewiesen werden, daß in dem theoretischen Modell von einem sphärischen Partikel mit einer glatten Oberfläche ausgegangen wird [58]. Der Erythrozyt hat jedoch eher eine diskoidale Form und eine haarige Oberfläche. Innerhalb der haarigen Oberfläche kann es zu einer Verringerung der effektiven Diffusionskonstanten kommen [26,27], was die Relaxationszeit der Konzentrationspolarisation entsprechend verlängert. Diese Verlängerung könnte die geringere Frequenz maximaler Rotation erklären.

Die Oberflächenladung, welche für die theoretischen Spektren angenommen werden mußte, war etwas höher als erwartet. Nach der Fixierung mit Glutaraldehyd sollten die roten Blutkörperchen eine Oberflächenladung von 0.029 C/m<sup>2</sup> haben [27]. Statt dessen wurde bei den Anpassungen in Bild 4.3 von 0.038 C/m<sup>2</sup> ausgegangen. Möglicherweise liegt hierfür die Ursache in der räumlichen Anordnung der Oberflächenladungen. Das theoretische Modell geht von einer flachen bzw. zweidimensionalen Ladungsverteilung aus. Im Falle einer räumlichen Ladungsverteilung ist die Oberflächenleitfähigkeit größer, als wenn die gleiche Ladung in einer Fläche verteilt wäre. Dies liegt an dem

größeren konvektiven Beitrag des endlichen elektrolytischen Flusses in der geladenen Oberfläche zu der Oberflächenleitfähigkeit.

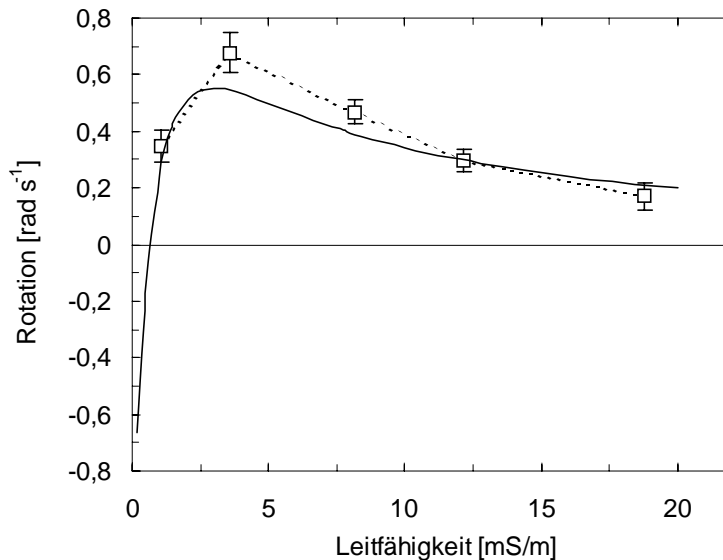


Bild 4.4: Die Geschwindigkeit der Zellrotation in Abhängigkeit von der externen Leitfähigkeit bei einer Feldfrequenz von 32 Hz (bzgl. der experimentellen und theoretischen Parameter siehe Bild 4.3).

Das Bild 4.4 zeigt die Rotationsgeschwindigkeit bei einer festen Feldfrequenz von 32 Hz in Abhängigkeit von der äußeren Leitfähigkeit. Es wurden die gleichen Parameter zur Anpassung der theoretischen an die experimentellen Werte wie im Bild 4.3 verwendet. Deutlich wird in diesem Bild nochmals die Übereinstimmung der Abhängigkeit der Rotationsgeschwindigkeit von der Leitfähigkeit der Messlösung. Beginnend bei 1 mS/m steigt diese zunächst an und fällt nach dem Erreichen eines Maximums kontinuierlich ab. Das Maximum der theoretischen Kurve liegt bei 3 mS/m. Im theoretischen Verlauf ist noch zu erkennen, daß es unterhalb von 1 mS/m bei ungefähr 0,65 mS/m zu einer Richtungsumkehr der Zellrotation kommen sollte. Dieser Wechsel konnte bei den GA-fixierten Erythrozyten nicht gefunden werden.

Um den Einfluß der Oberflächenladungsdichte auf die Elektrorotationsspektren im niederfrequenten Bereich zu untersuchen, wurden die Oberflächenladungen des Erythrozyten teilweise durch Neuraminidase abgebaut. Dazu wurden zunächst native Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Neuraminidase behandelt (s.a. Kapitel 2.2.2). Anschließend folgte die Fixierung der Erythrozyten mit Glutaraldehyd.

Die Folgen der Behandlung wurden durch Messung der elektrophoretischen Mobilität überwacht. Es ergab sich eine Reduktion um 70-80 % verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen (Bild 4.6). Im Bild 4.5 werden die experimentellen und theoretischen Elektrorotationsspektren der GA-fixierten Erythrozyten mit unterschiedlichen Oberflächenladungen dargestellt. An den experimentellen Daten erkennt man, daß bei der verwendeten Leitfähigkeit um 2,3 mS/m die Rotationsgeschwindigkeit der Zellen mit abnehmender Oberflächenladung ebenfalls abnahm. Im Bild 4.6 wird diese Abhängigkeit noch einmal verdeutlicht. Neben den relativen Mobilitäten sind hier die Mittelwerte aus den Verhältnissen der Rotationsgeschwindigkeit relativ zu den Kontrollzellen aufgetragen. Die Position des Maximums im Bild 4.5 weist keine Abhängigkeit von der Oberflächenladung auf.

Für das theoretische Spektrum der Kontrollzellen wurde wieder von einer Oberflächenladung von  $0,038 \text{ C/m}^2$  ausgegangen. Zwei weitere theoretische Kurven, welche die experimentellen Daten der mit Neuraminidase behandelten Zellen mehr oder weniger einhüllen, gehen von  $0,01$  und  $0,008 \text{ C/m}^2$  aus. Weiterhin mußte noch ein Reibungsfaktor von 2,05 angenommen werden. Geringe Variationen in Form, Größe und Oberflächenladung der Erythrozyten dürften ein wesentlicher Grund sein für die unterschiedlichen Reibungsfaktoren (die normalerweise zwischen eins und zwei lagen). Hinsichtlich der Oberflächenladung sollte in diesem Zusammenhang noch erwähnt werden, daß es keinen direkten Zusammenhang zwischen der elektrophoretischen Mobilität und der Oberflächenladung gibt. Dies liegt vor allem an der räumlichen Verteilung der Oberflächenladung, dem dynamischen Verhalten der Ladungsanordnung in sich ändernden elektrischen Potentialen und an dem Einfluß der Oberflächenleitfähigkeit auf die elektrophoretische Mobilität im Bereich niedriger Ionenstärken. Die theoretischen Oberflächenladungen lassen sich aber nach dem Standardmodell für einen sphärischen glatten Partikel unter Berücksichtigung der niedrigen Ionenstärke in die entsprechenden  $\zeta$ -Potentiale umrechnen. Bezogen auf die Kontrolle ergibt sich dann jeweils eine Abnahme auf 72 % und 60 %. Diese Werte sind nur geringfügig kleiner als es nach den elektrophoretischen Daten zu erwarten wäre. Da die Spektren an sedimentierten Zellen aufgenommen wurden, ist aber auch ein Einfluß von der Oberflächenladung auf den Reibungsfaktor zu erwarten. Die experimentellen

und theoretischen Werte der Höhe und Position der Maxima in den Spektren werden nochmals in Tabelle 4.2 zusammengefaßt.

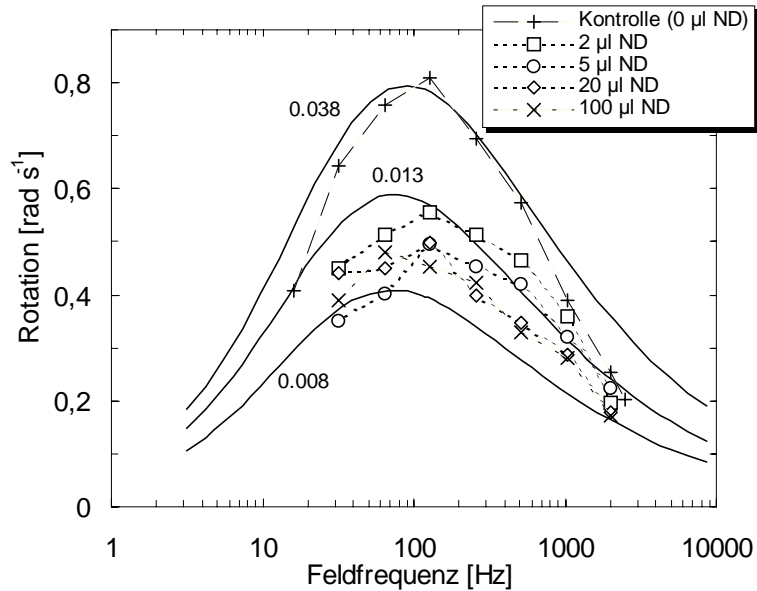


Bild 4.5: Experimentelle und theoretische Rotationsspektren im  $\alpha$ -Dispersionsbereich von GA-fixierten Erythrozyten mit unterschiedlichen Oberflächenladungen. Die Feldstärke betrug bei allen Messungen  $8 \cdot 10^3$  V/m und die Leitfähigkeit  $2,3 \pm 0,1$  mS/m. Die mittlere Standardabweichung betrug 19 % bei 20  $\mu$ l ND sonst lag sie bei 11-15 %. In der Legende werden die verwendeten Neuraminidase (ND)- Konzentrationen angegeben (s.a. Bild 4.6). Die durchgezogenen Linien stellen theoretische Spektren für verschiedene Oberflächenladungsdichten in  $C/m^2$  dar. Es mußte ein Reibungsfaktor von 2,05 bei einem Zellradius von 3,92  $\mu$ m angenommen werden.

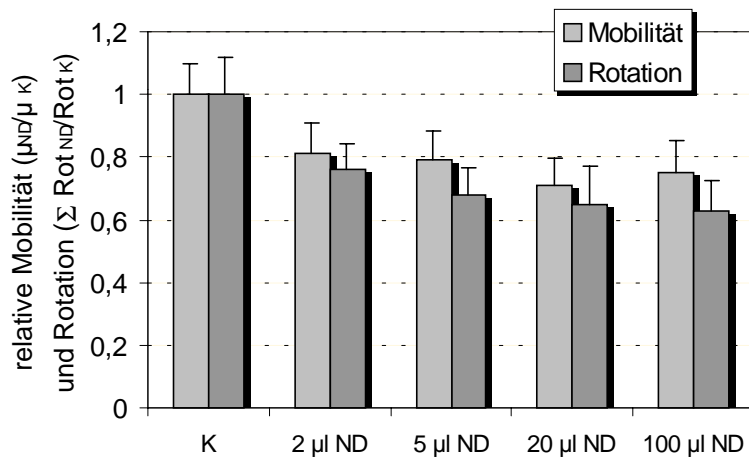


Bild 4.6: Mobilitäten der mit Neuraminidase behandelten und anschließend GA-fixierten Erythrozyten relativ zu den unbehandelten GA-fixierten Erythrozyten (mittlere Mobilität der Kontrollzellen wurde gleich eins gesetzt) sowie die mittlere relative Rotation bezüglich der Kontrollzellen.

Tabelle 4.2: Experimentelle (ex) und theoretische (th) Werte zum Bild 4.5.  $R_{cL}$  und  $f_{cL}$  stehen jeweils für die maximale Rotationsgeschwindigkeit und die dazugehörige Feldfrequenz. ND kennzeichnet die verwendete Neuraminidasekonzentration bei der Präparation (siehe Kp.2.2.2) und  $\sigma_o$  die Oberflächenladung in den theoretischen Spektren.

ND	0 µl	2 µl	5 µl	20 µl	100 µl
$f_{cL-ex}$ [Hz]	118	127	143	114	93
$R_{cL-ex}$ [rad s <sup>-1</sup> ]	0,87	0,60	0,52	0,52	0,56
$\sigma_o$ [C m <sup>-2</sup> ]	0,038		0,013		0,008
$f_{cL-th}$ [Hz]	90		75		72
$R_{cL-th}$ [rad s <sup>-1</sup> ]	0,80		0,59		0,41

Eine weitere Beobachtung, die Aufschluß über die Kräfte gibt, welche im  $\alpha$ -Dispersionsgebiet wirken, ist im Bild 4.7 illustriert. Zu sehen ist der öfters beobachtete Fall eines Paares von Zellen. Beide Erythrozyten ziehen sich gegenseitig durch Polarisationskräfte an, liegen also dicht beieinander. Dennoch rotieren sie unabhängig voneinander in der gleichen Richtung wie das rotierende Feld. Die Geschwindigkeit der Zellen unterscheidet sich dabei nicht von der einer einzelnen Zelle. Zusätzlich kann das Paar gemeinsam langsam in die entgegengesetzte Feldrichtung rotieren. Offensichtlich gibt es, trotz des geringen Zellabstandes, zwischen den GA-fixierten Erythrozyten keine deutliche hydrodynamische Wechselwirkung. Diese Beobachtung kann man durch die Existenz eines an die Rotation gekoppelten Flusses verstehen, welcher eine geringere



Reichweite hat als die Spalte zwischen den Zellen. Solch ein Fluß ist charakteristisch für den elektroosmotischen Beitrag zur Elektrorotation. Dies resultiert aus der Tatsache, daß die Rotation von einem elektroosmotischen Fluß außerhalb der elektrischen Doppelschicht null ist. Solch ein Fluß läßt keine hydrodynamische Wechselwirkung zwischen Teilchen zu, wenn diese deutlich weiter auseinander liegen als die Debye-Länge [7,28]. Somit kann das im Bild 4.7 beschriebene Verhalten als weiterer deutlicher Hinweis für die elektroosmotische Natur der Elektrorotation im  $\alpha$ -Dispersionsgebiet der GA-fixierten Erythrozyten verstanden werden. Im Kapitel 5 wird dieser Sachverhalt an Hand des Depletioneffektes von Dextran bei GA-fixierten Erythrozyten nochmals untermauert.

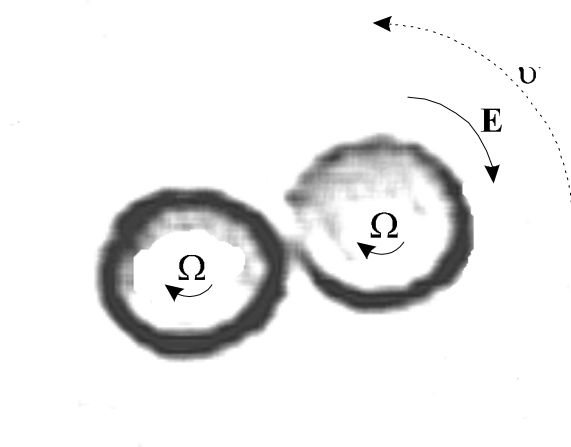


Bild 4.7: Schematische Darstellung des Rotationsverhaltens von zwei eng benachbarten GA-fixierten Erythrozyten im  $\alpha$ -Dispersionsbereich.

Nach dem theoretischen Konzept zur Elektrorotation im niederfrequenten Bereich ist die Rotationsgeschwindigkeit proportional zum Quadrat der Feldstärke. Eine Voraussetzung für dieses Modell ist, daß die Änderung der Ionenkonzentration im Feld überall wesentlich kleiner ist als die Gleichgewichtskonzentration. Für Partikel in der Größenordnung von Erythrozyten setzt dies für die angelegten Felder eine Feldstärke voraus, die wesentlich kleiner ist als  $10^4$  V/m [58]. Die meisten Versuche wurden in einem Feldstärkebereich zwischen  $5 \cdot 10^3$  V/m und  $8 \cdot 10^3$  V/m durchgeführt. Bis zu einer Feldstärke von  $1,2 \cdot 10^4$  V/m konnte keine Abweichung von der linearen Abhängigkeit beobachtet werden. Im Bild 4.8 wird die experimentelle Feldstärkeabhängigkeit zwischen  $3 \cdot 10^3$  V/m und  $12 \cdot 10^3$  V/m bei einer Feldfrequenz von 32 Hz dargestellt.

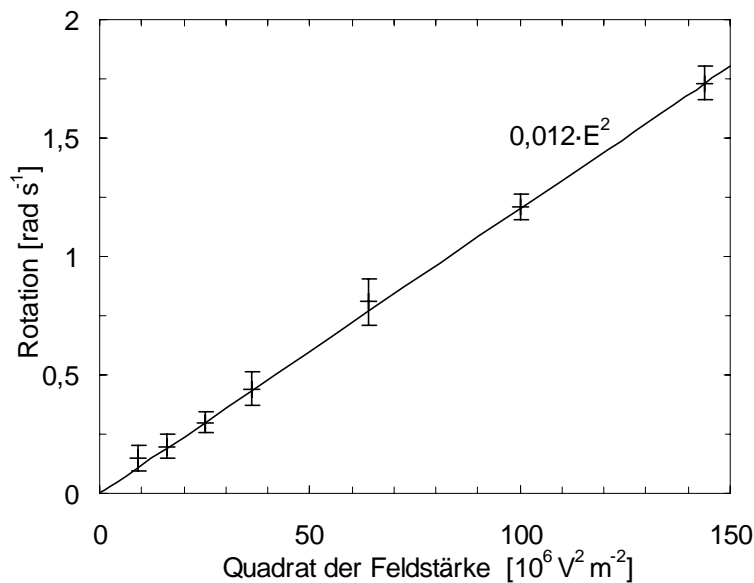


Bild 4.8: Feldstärkeabhängigkeit der Rotationsgeschwindigkeit GA-fixierter Erythrozyten bei einer Feldfrequenz von 32 Hz. Der Elektrodenabstand betrug 1mm und die externe Leitfähigkeit 1,5 mS/m.

Abschließend soll auf die Elektrorotation von GA-fixierten Erythrozyten im Gebiet der  $\beta$ -Dispersion eingegangen werden. Im Bild 4.9 sind drei Spektren in einem Frequenzbereich zwischen 2 kHz und 16 MHz bei drei verschiedenen Leitfähigkeiten zu sehen. Die Spektren zeigen eine maximale Rotation zwischen 300 kHz und 1,5 MHz. Bei niedrigen Ionenkonzentrationen ist die Rotation parallel zur Feldrichtung und wird bei Erhöhung der externen Leitfähigkeit antiparallel. Die Position der Rotationsmaxima wandert mit steigender Leitfähigkeit zu höheren Frequenzen.

Um die experimentellen Daten zu interpretieren wurde auf das Einschalen Modell zurückgegriffen (Kapitel 3.1.1). Der Vergleich der theoretischen mit den experimentellen Daten zeigt, daß sich GA-fixierte Erythrozyten wie leicht leitende Partikel verhalten. Es stimmt mit dem theoretischen Modell einer schwach leitenden Kugel umgeben von einer leitenden Schale überein. Für den Fall der Rotation in Feldrichtung muß die Leitfähigkeit der Kugel größer sein als die der umgebenden Lösung. Die Rotation entgegen der Feldrichtung ist mit einer inneren Leitfähigkeit konsistent, die etwas geringer ist als die äußere Leitfähigkeit.

Die Dielektrizitätskonstante wurde in den theoretischen Spektren sowohl für die Schale als auch für die Kugel gleich 78 gesetzt. Bei externen Leitfähigkeiten von 3,0 mS/m und

4,5 mS/m ergaben sich nach diesem Modell etwas höhere Leitfähigkeiten der Schale von jeweils 4,7 mS/m und 5,6 mS/m. Die inneren Leitfähigkeiten waren ebenfalls zur äußeren Leitfähigkeit mit jeweils 3,4 mS/m und 4,63 mS/m leicht erhöht. Bei einer höheren äußeren Leitfähigkeit von 15,0 mS/m zeigt dann das theoretische Spektrum eine etwas geringere innere Leitfähigkeit von 14,7 mS/m. Die Leitfähigkeit der Schale beträgt hier 16,0 mS/m

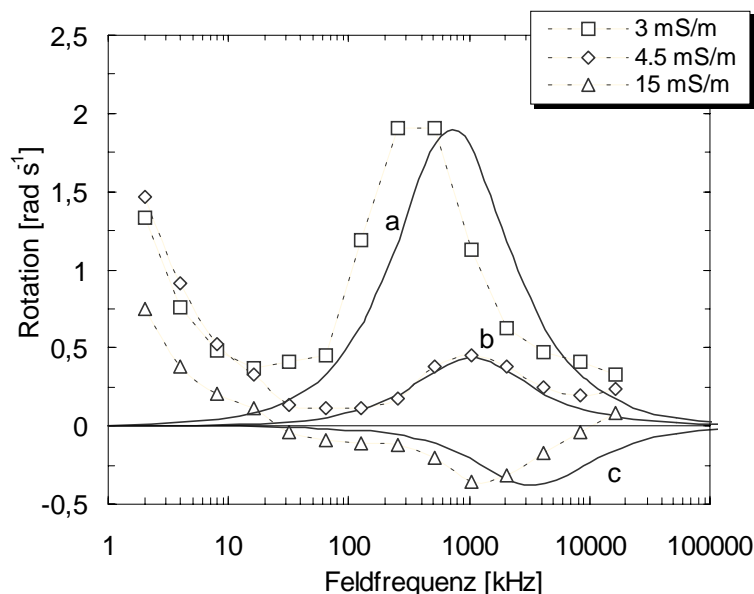


Bild 4.9: Vergleich von theoretischen und experimentellen Elektrorotationsspektren im hochfrequenten Bereich bei unterschiedlichen Leitfähigkeiten. Die Feldstärke betrug  $15 \cdot 10^3 \text{ V/m}$ . Für die theoretischen Spektren (durchgezogene Linien) wurde das Modell für einschalige Objekte verwendet. Es wurden leitende Sphären mit einer Leitfähigkeit von (a) 3,4 mS/m, (b) 4,63 mS/m und (c) 14,7 mS/m und leitende Schalen mit (a) 4,7 mS/m (b) 5,6 mS/m und (c) 16,0 mS/m. Die Dielektrizitätskonstante für den Partikel und das externe Medium betrug 78.

Durch Elektrorotationsdaten von nativen Erythrozyten ist bekannt, daß die innere Dielektrizitätskonstante bei 50 liegen sollte (s.a. Bild 4.1). Um die Elektrorotationsdaten der GA-fixierten Erythrozyten im höherfrequenten Bereich zu interpretieren war es notwendig eine Dielektrizitätskonstante von 78 anzunehmen. Dies kann ein Resultat des durch das Glutaraldehyd induzierten Vernetzen der Proteine sein sowie der drastische Erhöhung der Membranleitfähigkeit. Eine Folge könnte dann die Zunahme der inneren Dielektrizitätskonstante sein [12]. In diesem Zusammenhang ist auch noch interessant, daß die Elektrorotationsspektren im Bild 4.9 keinerlei Hinweis auf die Existenz einer Membran liefern.

Obwohl sich die Daten prinzipiell mit dem Modell eines kugelförmigen Partikels interpretieren lassen, sind exakte theoretische Beschreibungen der Maxima nicht möglich. Ein Grund neben der Vereinfachung der Erythrozytenform könnte auch an einem Einfluß liegen den die  $\alpha$ -Dispersion auch in diesem hohen Frequenzbereich noch hat.

## 4.2 Fixierte Thrombozyten

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur  $\alpha$ -Dispersion der GA-fixierten Erythrozyten haben sich fixierte Thrombozyten ebenfalls als Untersuchungsobjekt angeboten. Thrombozyten stellen insofern ein weiteres interessantes Modellpartikel dar, als ihr Durchmesser nur knapp ein Drittel bis Viertel von dem der Erythrozyten beträgt. Im  $\alpha$ -Dispersionsbereich hängt die Frequenz des Rotationsmaximums insbesondere vom Radius des Partikels ab (s.a. Kapitel 3.1.3).

Im Bild 4.10 werden die Elektrorotationsspektren von nativen und mit Formaldehyd fixierten Thrombozyten (FA-fixiert) bei einer externen Leitfähigkeit um 3 mS/m verglichen. Die nativen Zellen zeigen qualitativ ein ähnliches Spektrum wie die nativen Erythrozyten. Oberhalb von 1 kHz steigt die Rotationsgeschwindigkeit entgegen der Feldrichtung zunächst an, bis bei 70 kHz ein Maximum erreicht wird. Knapp unterhalb von einem MHz kehrt sich die Drehrichtung um. Die darauf folgende Maxwell-Wagner Dispersion konnte innerhalb des Meßbereiches nicht mehr vollständig erfaßt werden. Unterhalb von 1 kHz zeigen die Thrombozyten eine geringe Rotation parallel zur Feldrichtung. Im Verhältnis zu den Rotationsgeschwindigkeiten, die im  $\beta$ -Dispersionsgebiet erreicht werden, ist die  $\alpha$ -Dispersion ähnlich gering ausgeprägt wie bei den nativen Erythrozyten. Die durchgezogene Linie im Bild 4.10 zeigt ein theoretisches Spektrum nach dem Einschalen Modell (Kapitel 3.1.1). Die entsprechenden Parameter sind in der Legende zu finden. Das Spektrum der mit FA-fixierten Thrombozyten zeigt bei vergleichbarer externer Leitfähigkeit eine relativ zur  $\beta$ -Dispersion wesentlich ausgeprägtere  $\alpha$ -Dispersion. Außerdem ist das zweite Maximum deutlich zu niedrigeren Feldfrequenzen gewandert. Die absolute Rotationsgeschwindigkeit hat abgesehen von der  $\alpha$ -Dispersion durch die Fixierung der Zellen signifikant abgenommen.

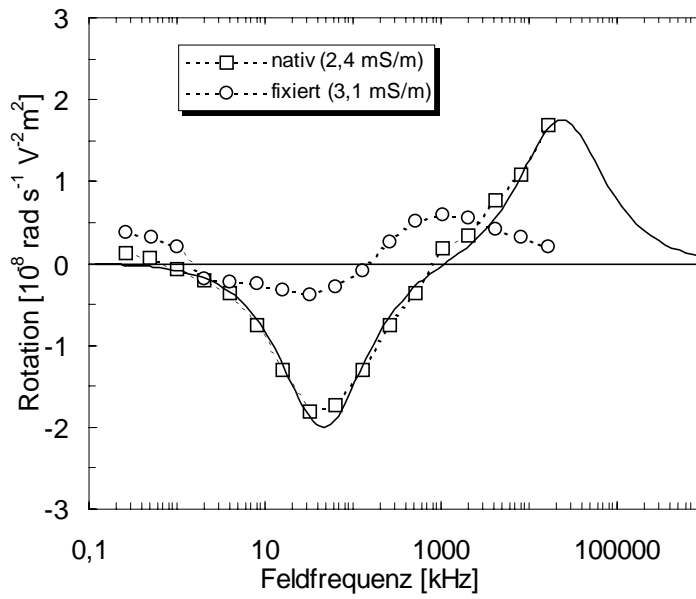


Bild 4.10: Vergleich der Elektrorotationsspektren von nativen und FA-fixierten Thrombozyten. Das Spektrum der nativen Zellen wurde in isotoner gepufferter NaCl-Lösung mit Sacharose bei einer Feldstärke von  $12 \cdot 10^3$  V/m aufgenommen. Das Spektrum der FA-fixierten Zellen wurde in KCl-Lösung bei einer Feldstärke von  $12,1 \cdot 10^3$  V/m aufgenommen. Die durchgezogene Linie ist ein theoretisches Spektrum (unabhängig von der Feldstärke und Viskosität) für die nativen Zellen unter Verwendung des Einschalen Modells (s.a.: Kp.3.1.1) mit folgenden Parametern:  $\epsilon_i = 50$ ,  $\epsilon_m = 10$ ,  $\epsilon_e = 78$ ,  $G_i = 0,25$  S/m,  $G_m = 4$   $\mu$ S/m,  $h = 5$  nm und  $R = 1$   $\mu$ m.

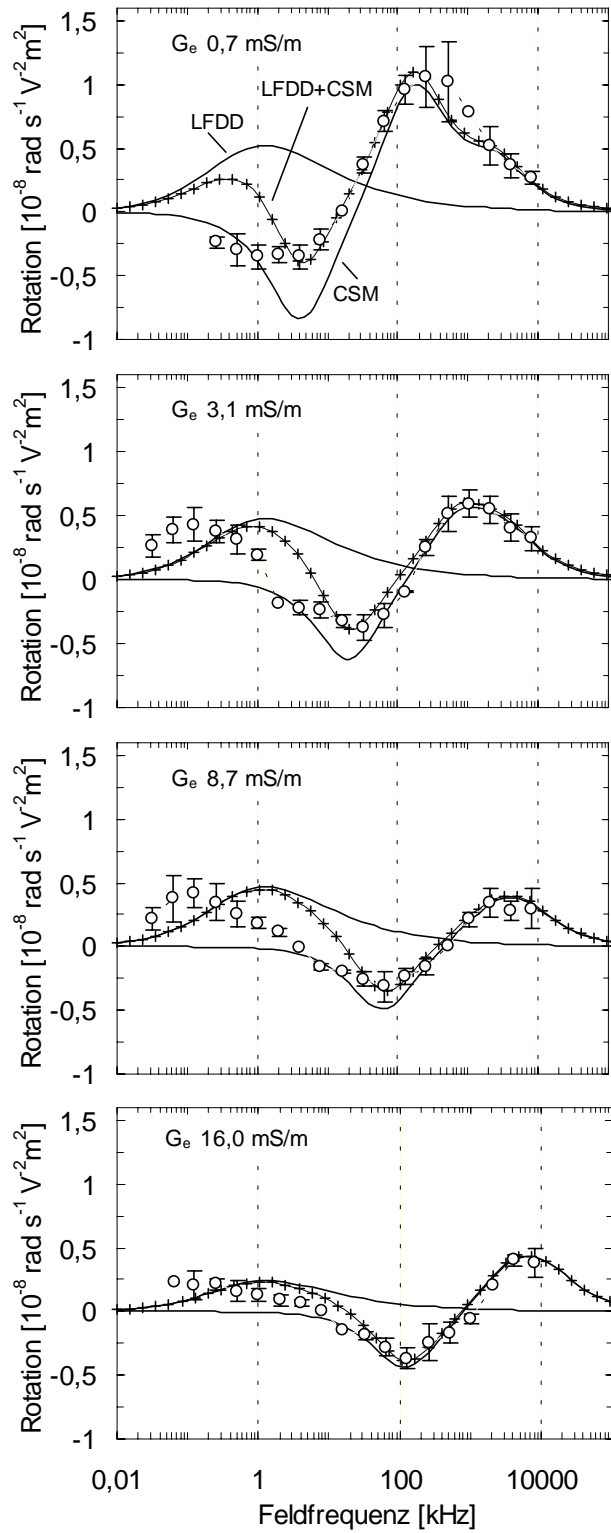


Bild 4.11: Elektrorotationsspektren von FA-fixierten Thrombozyten bei verschiedenen Leitfähigkeiten. Die Feldstärke betrug  $E=10 \text{ V/m}$  für  $f \leq 2 \text{ kHz}$  und  $E=12,1 \text{ V/m}$  für  $f > 2 \text{ kHz}$ . Für die theoretischen Spektren wurden die des kubisch strukturierte Modells (CSM) und des Niederfrequenz Modells (LFDD) addiert.

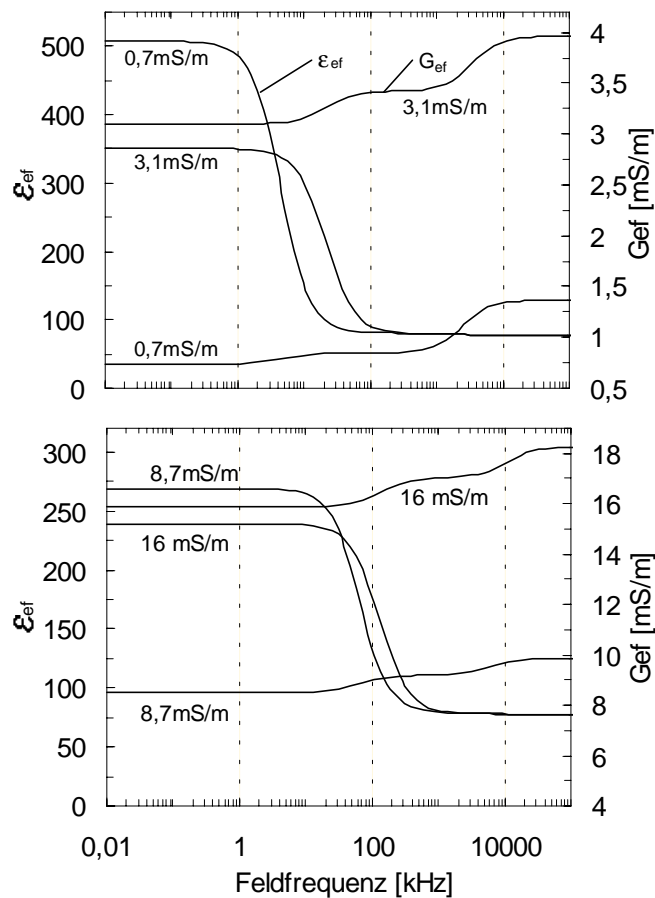


Bild 4.12: Effektive Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_{\text{ef}}$  (s. Kp. 3.1.3) und effektive innere Leitfähigkeit  $G_{\text{ef}}$  in Abhängigkeit von der Feldfrequenz. Die Parameter werden in Tabelle 4.3 wiedergegeben und die entsprechenden Elektrorotationsspektren in Bild 4.11.

Im Bild 4.11 sind Elektrorotationsspektren FA-fixierter Thrombozyten bei vier verschiedenen äußeren Leitfähigkeiten zwischen 0,7 mS/m und 16,0 mS/m im Frequenzbereich von 32 Hz bis 8 MHz zu sehen. Bei allen Leitfähigkeiten erkennt man oberhalb von 1 kHz zunächst ein Maximum der Rotation entgegen der Feldrichtung und bei steigender Feldfrequenz ein weiteres Rotationsmaximum parallel zur Feldrichtung. Die Position dieser Maxima wandert mit steigender Leitfähigkeit zu höheren Frequenzen. Gleichzeitig nimmt die Rotationsgeschwindigkeit des zweiten Maximums ab. Die Geschwindigkeit der Gegenfeldrotation weist hingegen keine signifikante Abhängigkeit von der Leitfähigkeit auf. Im niederfrequenten Bereich erkennt man ab einer Leitfähigkeit von 3,1 mS/m eine Rotation parallel zum Feld. Insbesondere die Leitfähigkeitsabhängigkeit der Rotation parallel zur Feldrichtung im oberen kHz- bis

MHz-Bereiches zeigt, daß durch die Fixierung der Thrombozyten die Durchlässigkeit der Membran stark zugenommen hat.

Um die Elektrorotationsspektren zu interpretieren, wurde eine modifizierte Form des kubisch strukturierten Modells (Kapitel 3.1.2) [32,37] mit der Theorie zur  $\alpha$ -Dispersion (Kapitel 3.1.3) superponiert. Die innere Struktur von Thrombozyten ist dadurch gekennzeichnet, daß sie verschiedene Vesikel enthalten, wie zum Beispiel Exocytosevesikel. Diese Inhomogenität des Innenraumes kann im kubisch strukturierten Modell näherungsweise durch Quader, die von einer Membran umgeben sind, berücksichtigt werden. Diese Quader haben einem festen Durchmesser und festen Abstand zueinander.

Die theoretischen Spektren im Bild 4.11 zeigen im Bereich der  $\beta$ -Dispersion eine recht gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Die theoretischen Parameter werden in Tabelle 4.3 wiedergegeben. Die Leitfähigkeit der äußeren Membran wurde gleich der externen Leitfähigkeit gesetzt. Die Leitfähigkeit der Vesikelzwischenräume lag immer geringfügig über der äußeren Leitfähigkeit. Die Innenleitfähigkeit der Innenvesikel  $G_{in}^v$  lag immer deutlich über der Leitfähigkeit der Lösung.  $G_{in}^v$  weist eine deutliche Abhängigkeit von der äußeren Leitfähigkeit  $G_e$  auf. Mit abnehmender externer Leitfähigkeit nimmt auch die Innenleitfähigkeit der Vesikel ab. Die Membranleitfähigkeit  $G_m^v$  der Innenvesikel mußte dagegen bei allen Leitfähigkeiten wesentlich geringer gewählt werden, nimmt aber auch mit der äußeren Leitfähigkeit ab. Für die Dielektrizitätskonstanten wurde sowohl bei der Membran der Innenvesikel  $\epsilon_m^v$  als auch beim Innenraum der Innenvesikel  $\epsilon_{in}^v$  ein Wert von 50 angenommen. Die Dielektrizitätskonstante für den übrigen Zellzwischenraum  $\epsilon_g$  und die Zellmembran  $\epsilon_m$  wurde gleich 78 gesetzt. Für die geometrischen Parameter der Innenvesikel folgte bei einem Durchmesser (bzw. Seitenlänge der Quader) von  $L^v=0,3 \mu m$  ein mehr als doppelt so großer Abstand von  $d=0,65 \mu m$ .



Tabelle 4.3: Parameter die für die theoretischen Elektrorotationsspektren aus Bild 4.11 variiert wurden ( $G_e$ : externe Leitfähigkeit;  $G_m^v$ : Leitfähigkeit der Vesikelmembran;  $G_{in}^v$ : Leitfähigkeit des Vesikelinneren;  $\sigma$ : Oberflächenladungsdichte der Zelle). Folgende Parameter wurden konstant gehalten. *Vesikelparameter*: Membrandicke  $h^v = 5\text{nm}$ , Dielektrizitätskonstante der Membran  $\epsilon_m^v = 50$  und des Inneren  $\epsilon_{in}^v = 50$  sowie der Durchmesser  $L^v = 0,3\text{ }\mu\text{m}$ ; *Zellparameter*: Membranleitfähigkeit  $G_m = G_e$ , Spaltdurchmesser  $d = 0,65\text{ }\mu\text{m}$ , Dielektrizitätskonstante der Membran  $\epsilon_m = 78$  und des Spaltes  $\epsilon_g = 78$ .

$G_e$ [mS/m]	<b>0,7</b>	<b>3,1</b>	<b>8,7</b>	<b>16,0</b>
$G_{in}^v$ [mS/m]	11	15	25	45
$G_g$ [mS/m]	0,815	3,33	9,0	16,7
$G_m^v$ [ $\mu\text{S/m}$ ]	0,5	14	65	150
$\sigma$ [ $\text{C/m}^2$ ]	$0,5 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$3,4 \cdot 10^{-3}$	$3,6 \cdot 10^{-3}$

Tabelle 4.4: Charakteristische Frequenzen der experimentellen (ex) und theoretischen (th) Spektren der FA-fixierten Thrombozyten. cL, c1 und c2 stehen jeweils für das Maximum im  $\alpha$ -Dispersionsbereich sowie das erste und zweite Maximum im  $\beta$ -Dispersionsbereich.

$G_e$ [mS/m]	<b>0,7</b>	<b>3,1</b>	<b>8,7</b>	<b>16,0</b>
$f_{cL\text{-ex}}$ [Hz]		122	120	
$f_{cL\text{-th}}$ [Hz]	379	864	1120	1130
$f_{c1\text{-ex}}$ [kHz]	1,43	26,1	58	108
$f_{c1\text{-th}}$ [kHz]	4,52	22,6	69	127
$f_{c2\text{-ex}}$ [MHz]	0,273	1,22	3,8	
$f_{c2\text{-th}}$ [MHz]	0,178	1,01	3,91	6,48

An Hand dieses Modells läßt sich vermuten, daß die Fixierung mit Formaldehyd vergleichbare Auswirkungen auf die dielektrischen Zellparameter von Thrombozyten hat wie die Fixierung der Erythrozyten mit Glutaraldehyd. Zunächst deuten die Spektren eine erhöhte Durchlässigkeit der äußeren Lipidmembran an. Dies führt zu einer drastischen Abnahme der Volumenleitfähigkeit  $G_g$ , welche im wesentlichen die Höhe des zweiten Maximums parallel zur Feldrichtung festlegt. Dieses Maximum wird noch durch die deutlich höhere Innenleitfähigkeit von einigen Innenvesikeln  $G_{in}^v$  verbreitert. Diese weisen auch eine deutlich geringere Membranleitfähigkeit  $G_m^v$  auf, welche zu einer Rotation entgegen der Feldrichtung bei etwas niedrigeren Feldfrequenzen führt. Aus der Inhomogenität des Innenraumes der Thrombozyten kann man die effektive und frequenzabhängige Innenleitfähigkeit  $G_{ef}$  sowie die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_{ef}$  berechnen (S. 30 Gleichung (3.19) und (3.20)). Die

entsprechenden Funktionen zu den theoretischen Spektren aus Bild 4.11 werden im Bild 4.12 dargestellt.

Im Bereich der  $\alpha$ -Dispersion zeigen die theoretischen Spektren im Bild 4.11 eine deutliche Verschiebung des Maximums zu höheren Feldfrequenzen. Um hier die theoretischen Verläufe an die experimentellen Daten anzugleichen, wurde, abgesehen von dem Einfluß der  $\beta$ -Dispersion, nur die Oberflächenladung der Thrombozyten variiert. Ab einer Leitfähigkeit von 3,1 mS/m geschah dies durch angleichen der maximalen experimentellen Rotationsgeschwindigkeiten an die theoretischen. Wie in Tabelle 4.3 zu sehen nimmt die Oberflächenladungsdichte kontinuierlich von 1,5 mC/m<sup>2</sup> bei 3,1 mS/m bis auf 3,6 mC/m<sup>2</sup> bei 16 mS/m zu. Bei einer Leitfähigkeit von 0,7 mS/m wird unter der Annahme einer weiteren kontinuierlichen Abnahme der Oberflächenladungsdichte mit abnehmender Ionenstärke von 0,5 mC/m<sup>2</sup> ausgegangen, um im theoretischen Spektrum die  $\alpha$ -Dispersion nicht zu vernachlässigen. Elektrophoretische Messungen an nativen Thrombozyten zeigten bereits, daß die Oberflächenladung mit der Ionenstärke abnimmt [10]. Die Ursache für dieses Verhalten liegt darin, daß Oberflächenstruktur und -ladung auf Veränderungen der Ionenstärke reagiert. Bei abnehmender Ionenstärke wird das negative Oberflächenpotential durch die geringere elektrostatische Abschirmung zunächst zunehmen. Dieser Prozeß führt aber gleichzeitig zu einem anwachsen des pH an der Zelloberfläche. Wenn nun der pK dieser Polyelektrolytstruktur im Bereich des pH der Lösung liegt, folgt eine geringere Dissoziation. Insgesamt nimmt die gemessene effektive Oberflächenladung ab. Auch bei FA-fixierten Thrombozyten konnte mit Elektrophorese ein ähnlicher Zusammenhang festgestellt werden. Wenn vereinfachend ein glatter sphärischer Partikel angenommen wird, fällt bei FA-fixierten Thrombozyten die Oberflächenladung zwischen 46 mS/m und 0,3 mS/m von 6,2 mC/m<sup>2</sup> auf 0,8 mC/m<sup>2</sup>. Diese Werte liegen in dem Bereich, wie die in den theoretischen Spektren verwendeten Werte (siehe Tabelle 4.3).

Die Überlagerung der  $\alpha$ -Dispersion und der  $\beta$ -Dispersion durch Addition der Spektren zeigt eine recht gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Es fällt auf, daß die Innenvesikel im theoretischen Ansatz einen recht großen Abstand zueinander haben. Nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen (z.B. in [37]) ist ein wesentlich geringerer

Vesikelabstand und demzufolge eine höhere Vesikelkonzentration zu erwarten. Da im kubisch strukturierten Modell nur von einem Vesikeltyp ausgegangen wird, ist zu vermuten, daß die FA-Fixierung die unterschiedlichen Vesikel nicht einheitlich hinsichtlich ihrer Struktur verändert. Die berechneten Werte können somit nur über alle Eigenschaften gemittelte effektive Parameter der Vesikel sein.

Im niederfrequenten Dispersionsgebiet fällt die systematische Verschiebung der Position des theoretischen Maximums zu höheren Frequenzen auf. Die Position der experimentellen Maxima bei 3,1 mS/m und 8,7 mS/m im Bild 4.11 entsprechen ungefähr der, wie sie für ein knapp viermal so großes Partikel zu erwarten wäre. Ein möglicher Grund könnte in der Struktur und der Größe der Trombozyten liegen. In dem Modell zur  $\alpha$ -Dispersion wird zum einen von einem glatten Partikel ausgegangen und zum anderen von einem Partikelradius der wesentlich größer ist als die Debye-Länge. Eventuell macht sich hier die Verletzung dieser beiden Voraussetzungen bemerkbar. Eine haarige Oberfläche, wie sie Thrombozyten haben, wird sicherlich zu einer Verringerung der Ionendiffusionszeiten führen. Ein weiteres Problem, welches genauso für die  $\beta$ -Dispersion gilt, ist, daß die Superposition eine zu grobe Vereinfachung darstellen kann. Bei der Addition der theoretischen Spektren wird nicht die Möglichkeit eines gegenseitigen Einflusses berücksichtigt.

### 4.3 Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels konnte gezeigt werden, daß mit Glutaraldehyd fixierte Erythrozyten in dem Frequenzbereich zwischen 10 Hz und 1 kHz eine deutliche Elektrorotation parallel zur Feldrichtung aufweisen. Die experimentellen Spektren sind mit dem theoretischen Modell (Kapitel 3.1.3) zur Elektrorotation im niederfrequenten Bereich konsistent. Im Bereich der  $\beta$ -Dispersion wird die Elektrorotation durch die Leitfähigkeiten und die Dielektrizitätskonstanten von Membran und den übrigen Zellkompartimenten bestimmt. Im Gegensatz dazu wird im Gebiet der  $\alpha$ -Dispersion die Elektrorotation durch die Oberflächenleitfähigkeit und die Oberflächenladung bestimmt. Die im Bereich der  $\beta$ -Dispersion bekannte Äquivalenz von Elektrorotation und Impedanzmessung geht als Folge des elektroosmotischen Anteils der niederfrequenten Elektrorotation verloren.

Im zweiten Teil wurden experimentelle Elektrorotationsspektren FA-fixierter Thrombozyten im  $\alpha$ - und  $\beta$ -Dispersionsbereich untersucht. Die experimentellen Daten wurden mit einer Kombination aus dem kubisch strukturierten Modell und dem Modell zur  $\alpha$ -Dispersion verglichen. Beim kubisch strukturierten Modell wurde eine etwas modifizierte Ansatz des ursprünglichen Modells verwendet [32]. Die Erweiterung bestand in der Ausdehnung auf beliebige Vesikelkonzentrationen und -abstände. Das herkömmliche Modell ist auf kleine Vesikelabstände im Verhältnis zum Vesikeldurchmesser beschränkt.

Die experimentellen Spektren der FA-fixierten Thrombozyten (S. 58 Bild 4.11) zeigten gerade im Bereich der  $\beta$ -Dispersion eine sehr gute Übereinstimmung mit den theoretisch berechneten Verläufen. Um die Zuverlässigkeit dieses Modells abschließend beurteilen zu können, bedarf es in Zukunft weiterer Untersuchungen an z.B. Aggregaten oder Partikeln, die durch entsprechende Innenstrukturen auffallen. Im niederfrequenten Bereich stellten sich größere Abweichungen zwischen Experiment und Theorie ein. Hier lag die theoretische Frequenz maximaler Rotation immer bei deutlich höheren Frequenzen als im Experiment.

Die Theorie zur niederfrequenten Elektrorotation beschreibt nur das Standardmodell einer elektrischen Doppelschicht um ein kugelförmiges Partikel. Weitere theoretische Ansätze werden nötig sein, um diese Theorie auf beliebige Partikel anwenden zu können. So muß zum einen der Einfluß von haarigen Oberflächenstrukturen geklärt werden, zumal zahlreiche biologische und nicht biologische Partikel über solch eine Struktur verfügen (z.B. Erythrozyten). Außerdem muß die Theorie für den Fall beliebig großer Debye-Längen im Verhältnis zum Partikelradius erweitert werden. Da sich die  $\alpha$ -Dispersion nur bei geringen äußeren Leitfähigkeiten beobachten läßt, muß man zwangsläufig mit relativ großen Debye-Längen arbeiten. Dies könnte auch die Ursache für die Abweichungen zwischen Theorie und Experiment bei den Untersuchungen der FA-fixierten Thrombozyten im  $\alpha$ -Dispersionsbereich sein.

## 5 Erfassung von Polymer-Depletionschichten im Alpha-Dispersionsbereich

Ziel dieses Kapitels ist den Einfluß von Depletionschichten auf die Elektrorotation im  $\alpha$ -Dispersionsgebiet darzustellen. Ausgehend von der Schlußfolgerung des letzten Kapitels, daß die Elektrorotation im  $\alpha$ -Dispersionsbereich durch Elektroosmose wesentlich beeinflusst wird, sollten sich makromolekulare Depletionschichten mit Hilfe von Elektrorotation detektieren lassen. Dazu werden zunächst im Kapitel 5.1 elektrophoretische Untersuchungen in Dextranlösungen vorgestellt. Dies dient in erster Linie der Quantifizierung des Depletioneffektes bei den verwendeten Konzentrationen und Molekulargewichten von Dextran. Auf dieser Grundlage folgen im zweiten Teil die Untersuchung und Interpretation der Elektrorotation von fixierten Erythrozyten im niederfrequenten Bereich in Anwesenheit von Dextrandepletionschichten.

### 5.1 Depletion in Dextranlösungen

Im Bild 5.1 werden die Verhältnisse der elektrophoretischen Mobilität von fixierten Erythrozyten in Natriumchloridlösung  $\mu_s$  zu den in Dextranlösung  $\mu_p$  für unterschiedliche Debye-Längen dargestellt. Die Debye-Länge wurde bei den Versuchen durch die Variation der Konzentration von Natriumchlorid erreicht. Für die Messungen wurde Dextran mit den Molekulargewichten 71 kDa, 464 kDa und 2400 kDa verwendet. Die Konzentration betrug immer 2 g/dl. Das Viskositätsverhältnis der Dextranlösungen zu den Kochsalzlösungen  $\eta_p/\eta_s$  betrug jeweils 1,73 für 71 kDa Dextran, 2,46 für 464 kDa Dextran und 3,61 für 2400 kDa Dextran.

Das Verhältnis  $\mu_s/\mu_p$  zeigte für die Lösungen mit Dextran von einem Molekulargewicht von 464 kDa und von 2400 kDa über den gesamten Messbereich eine lineare Abhängigkeit von der Debye-Länge. Außerdem war es immer kleiner als das entsprechende Viskositätsverhältnis  $\eta_p/\eta_s$ . Bei Verwendung von Dextran mit einem Molekulargewicht von 71 kDa war diese Abhängigkeit nur bis zu einer Debye-Länge von ungefähr 5 nm linear. Bis zu diesem Wert war die Mobilität auch noch größer als nach der Viskosität zu erwarten. Oberhalb dieser Länge erreichte dann das

Mobilitätsverhältnis das Viskositätsverhältnis. In keinem Fall überstieg das Mobilitätsverhältnis signifikant das Viskositätsverhältnis. Auffällig war noch das etwas größere Mobilitätsverhältnis der fixierten Erythrozyten in der Lösung mit 464 kDa Dextran gegenüber der mit 2400 kDa Dextran im gesamten Messbereich. Nur bei einer Debye-Länge um 7,5 nm überstieg das Mobilitätsverhältnis der 2400 kDa Lösung geringfügig den Wert, der in der 464 kDa Lösung erreicht wurde. Die Viskosität der 2400 kDa Lösung war dagegen deutlich größer.

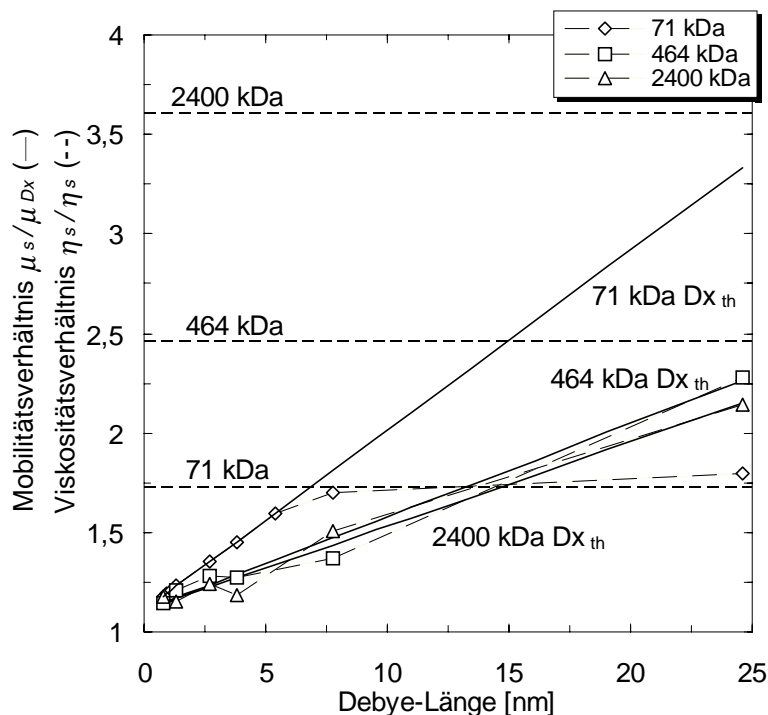


Bild 5.1: Verhältnis der elektrophoretischen Mobilität  $\mu_s/\mu_{Dx}$  von fixierten Erythrozyten in gepufferten Lösungen (pH = 7.4) mit unterschiedlichen Natriumchloridkonzentrationen ohne zusätzliches Dextran  $\mu_s$  und mit 2 g/dl Dextran  $\mu_{Dx}$  unterschiedlicher Molekularmassen. Die durchgezogenen Linien sind theoretische Abhängigkeiten nach Gleichung (3.48) auf Seite 40. Die verwendeten theoretischen Parameter und das Verhältnis der Viskositäten werden in Tabelle 5.1 zusammengefaßt.

Neben den experimentellen Daten wird im Bild 5.1 auch die lineare theoretische Abhängigkeit dargestellt, wie sie näherungsweise für Depletionschichten gilt, die deutlich größer sind als Dicke der Doppelschicht (S. 40 Gl. (3.48)). Die beiden freien Parameter,  $\lambda$  sowie die Viskosität  $\eta_0$  an der Oberfläche der haarigen Schicht des Erythrozyten wurden durch Angleichen der linearisierten Gleichung an die experimentell bestimmten Mobilitätsverhältnisse festgelegt. Beide Parameter

bestimmen unterschiedliche Eigenschaften des Mobilitätsverhältnisses  $\mu_s/\mu_{Dx}$ . Das Maß für die Schichtdicke  $\lambda$  legt die Steigung in Abhängigkeit von der Debye-Länge fest, während die Viskosität den absoluten Wert von  $\mu_s/\mu_{Dx}$  bestimmt. In Tabelle 5.1 werden die ermittelten Werte zusammengefaßt.

Der Längenparameter  $\lambda$  lag in der gleichen Größenordnungen wie der Gyrationradius der Dextran-Moleküle [96]. Auffällig ist die etwas höhere Viskosität  $\eta_0$  an der Zelloberfläche verglichen mit der des Lösungsmittels. Diese Viskositätszunahme ist auf an der Erythrozytenoberfläche immobilisierte Dextranmoleküle zurückzuführen. Inwieweit die Dextranmoleküle adsorbiert sind oder auch nur eine hydrodynamische Wechselwirkung mit der Zelloberfläche eingehen, läßt sich durch Elektrophorese nicht entscheiden [10].

Tabelle 5.1: Zusammenstellung der theoretische Viskositätsverhältnisse  $\eta_0/\eta_s$  ( $\eta_0$ : an der Zelloberfläche, siehe Kapitel 3.2), Viskositätsverhältnis der Dextranlösung zu den Salzlösungen  $\eta_{Dx}/\eta_s$  und die Dicke der Depletionschicht  $\lambda$  für fixierte Erythrozyten in unterschiedlichen Dextran Lösungen.

Dextran [kD]	Dextran [g/dl]	$\eta_{Dx}/\eta_s$	$\eta_0/\eta_s$	$\lambda$ [nm]
71	2	1,73	1,11	4,4
71 <sup>1</sup>	4	2,64	1,23	2,9
464	2	2,46	1,11	13,0
464	3	3,72	1,22	11,9
2.400	2	3,61	1,11	18,2

Im Bild 5.2 werden die Verläufe der Viskositäten in Abhängigkeit vom Abstand zur Zelloberfläche für verschiedene Dextranlösungen dargestellt. Die Berechnung der Profile erfolgte unter der Annahme des exponentiellen Viskositätsverlaufes, wie er in der Gleichung (3.47) auf Seite 40 beschrieben wird. In diese Gleichung wurden die theoretischen und experimentellen Werte aus Tabelle 5.1 eingesetzt. Zu sehen sind die Profile von Dextranlösungen mit 2 und 4 g/dl 71 kDa Dextran, 2 und 3 g/dl 464 kDa Dextran und 2 g/dl 2400 kDa Dextran. Nur bei den Lösungen mit 71 kDa Dextran wurde annähernd der Viskositätswert der Lösungen in einem Abstand erreicht, der geringer war als die Debye-Länge bei der niedrigsten verwendeten Ionenstärke.

<sup>1</sup> Werte aus [10] übernommen

Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Lösungen mit gleicher Konzentration aber unterschiedlichen Molekulargewichten fällt im Bild 5.2 für niedrige Oberflächenabstände auf, daß beim geringsten Molekulargewicht von 71kDa die Viskosität am größten war. Der Vergleich zwischen dem 464kDa und dem 2400kDa lieferte einen etwas größeren Viskositätswert des 464kDa Dextran bis zu einer Distanz von ca. 13nm. Bei größeren Abständen zur Oberfläche kehrte sich diese Reihenfolge um. Dann wurde die größere Viskosität der höhermolekularen Dextranlösungen entscheidend. Bei geringen Oberflächenabständen machte sich dagegen der steilere Viskositätszuwachs der Dextranlösungen mit niedrigerem Molekulargewicht bemerkbar.

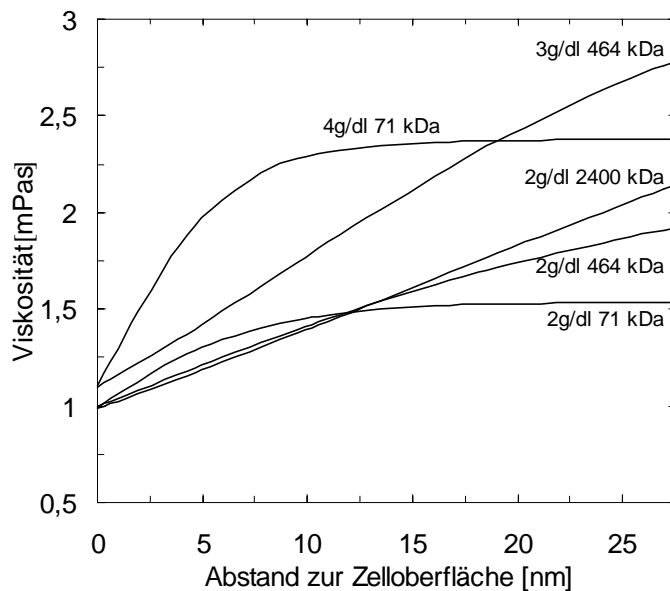


Bild 5.2: Viskositätsprofile als Funktion des Abstandes von der Partikeloberfläche für unterschiedliche Dextrankonzentrationen und Molekulargewichte nach Gleichung (3.47) auf Seite 40. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 5.1 zu finden.

Die experimentell ermittelten Mobilitätsverhältnisse in Bild 5.1 spiegeln die in Bild 5.2 berechneten Viskositätsprofile wieder. Nach den Viskositätsprofilen sollten die fixierten Erythrozyten bis zu einer Debye-Länge von 11 nm in der 71 kDa Dextranlösung (2 g/dl) eine geringere Mobilität haben als in den Lösungen mit 464 kDa und 2400 kDa Dextran. Bei größerer Debye-Länge müßten dagegen die Mobilitätsverhältnisse, die in der 71 kDa Lösung gemessen wurden, kleiner werden als die in den 464 kDa und 2400 kDa Lösungen. Der Unterschied zwischen den



Viskositätsprofilen des 464 kDa und 2400 kDa Dextran ist bis zu einem Oberflächenabstand von 25 nm nicht allzu gravierend. Bis zu einer Debye-Länge um 15 nm ist eine etwas größere Mobilität in der 464 kDa Lösung zu erwarten. Oberhalb dieses Wertes sollte die Mobilität etwas unterhalb der Mobilität in der 2400 kDa Lösung zu finden sein.

Die elektrophoretischen Mobilitätsverhältnisse im Bild 5.1 stimmen mit den obigen Deutungen der Viskositätsprofile gut überein. Bei einer Debye-Länge um 14 nm schneiden die Mobilitätsverhältnisse der fixierten Erythrozyten in der 71 kDa Lösung die in den 464 kDa und 2400 kDa Lösungen. Bei niedrigen Ionenstärken liegt die Mobilität im 71 kDa Dextran dann deutlich über den Verhältnissen wie sie bei 464 kDa und 2400 kDa zu finden sind. Bei der niedrigsten Ionenstärken ist das Mobilitätsverhältnis in der 464 kDa Lösung etwas größer als in der 2400 kDa Lösung, obwohl nach den Viskositätsprofilen das Gegenteil eintreten sollte. Die nach den Viskositätsprofilen zu erwartenden Unterschiede sind auch nur gering.

## 5.2 Elektrorotation in Dextranlösungen

Als erstes soll der Einfluß des Molekulargewichtes des verwendeten Dextran auf die Elektrorotation im  $\alpha$ -Dispersionsbereich untersucht werden. Dazu werden im Bild 5.3 Elektrorotationsspektren von fixierten Erythrozyten bei einer Leitfähigkeit von 2,1 mS/m im Frequenzbereich zwischen 32 Hz und 2 kHz dargestellt. Wie bereits im Kapitel 4 beschrieben, läßt sich in diesem Frequenzbereich bei fixierten Erythrozyten nur eine Rotation parallel zur Feldrotation beobachten. Die Spektren wurden jeweils in Lösungen mit 71 kDa Dextran bei einer Konzentration von 4 g/dl, 464 kDa Dextran bei einer Konzentration von 3 g/dl, 2400 kDa Dextran bei einer Konzentration von 2 g/dl sowie in einer Kontrollösung ohne Dextran aufgenommen. Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden gewählt, um alle Spektren bei vergleichbarer Viskosität aufzunehmen.

Die Viskosität betrug jeweils 2,3 mPas für 71 kDa Dextran, 3,4 mPas für 464 kDa Dextran und 3,5 mPas für 2400 kDa Dextran. Bei kleinen Rotationsgeschwindigkeiten soll diese normalerweise proportional zum Kehrwert der Viskosität sein. Dennoch war die Rotationsgeschwindigkeit in der Lösung mit 2400 kDa größer als in den übrigen

Dextranlösungen. Auch der Vergleich zwischen den Spektren im 464 kDa Dextran und im 71 kDa Dextran widersprach der zu erwartenden Proportionalität. Um die Spektren in den Dextranlösungen quantitativ mit dem Kontrollspektrum zu vergleichen, sind im Bild 5.4 die Verhältnisse der Rotationsgeschwindigkeiten in der Kontrolllösung zu denen in den Dextranlösung in Abhängigkeit von der Feldfrequenz aufgetragen. Zum Vergleich wurden in der Abbildung auch die Viskositätsverhältnisse dargestellt. Das Verhältnis in der 2400 kDa Lösung lagen über den gesamten Frequenzbereich deutlich unter dem Verhältnis der Viskositäten. Beim 464 kDa Dextran war dieses ebenfalls immer unterhalb zu finden, allerdings ist der Unterschied bei Frequenzen kleiner als 100 Hz nicht mehr so signifikant. Beim 71 kDa Dextran war die Rotationsgeschwindigkeit unterhalb von 100 Hz sogar langsamer als eigentlich zu erwarten wäre und oberhalb wie bei den anderen Lösungen schneller, wenn auch bei weitem nicht so deutlich wie beim höhermolekularen Dextran. Dieses Rotationsverhalten läßt sich auf der Grundlage der Viskositätsprofile (Bild 5.2), die sich durch einen Depletionseffekt ausbilden, sowie dem elektroosmotischen Konzept der  $\alpha$ -Dispersion interpretieren.

Die Viskositäten der Lösung mit 464 kDa Dextran sowie die mit 2400 kDa Dextran weichen nur geringfügig voneinander ab. Innerhalb der Depletionschicht unterscheiden sich die Viskositätsprofile jedoch erheblich (Bild 5.2). Durch die schmalere Depletionschicht bei der 464 kDa Dextran-Lösung wird die Volumenviskosität bereits bei kleineren Oberflächenabständen erreicht. Bei einer Konzentration von 2 g/dl betrug der experimentell ermittelte Parameter  $\lambda$ , der die effektive Dicke der Depletionschicht beschreibt, bei einem Molekulargewicht von 2400 kDa 18,2 nm und bei 464 kDa nur 13,0 nm (siehe Tabelle 5.1). Unter den gewählten experimentellen Bedingungen lag die Debyelänge bei 23 nm. Wegen der Unterschiede in der Dicke der Depletionschicht erfährt der elektroosmotische Fluß in den Lösungen mit höhermolekularen Dextran einen geringeren Widerstand. So ist zum Beispiel der Reibungswiderstand in der Lösung mit dem 2400 kDa Dextran geringer als in der 464 kDa Lösung, weil die Depletionschicht in der höhermolekularen Lösung weiter in die elektrische Doppelschicht vordringt. Analog läßt sich die Rotationsgeschwindigkeit beim 71 kDa Dextran im Bild 5.3 verstehen. Die Lösung des 71 kDa Dextran hatte bei einer

Konzentration von 4 g/dl einen Depletionparameter  $\lambda$  von 2,9 nm, was nur knapp einem Achtel der Debyelänge entspricht. Dies erklärt die geringe aber noch sichtbare Auswirkung des Depletioneffektes auf die Rotation zwischen 200 Hz und 2 kHz.

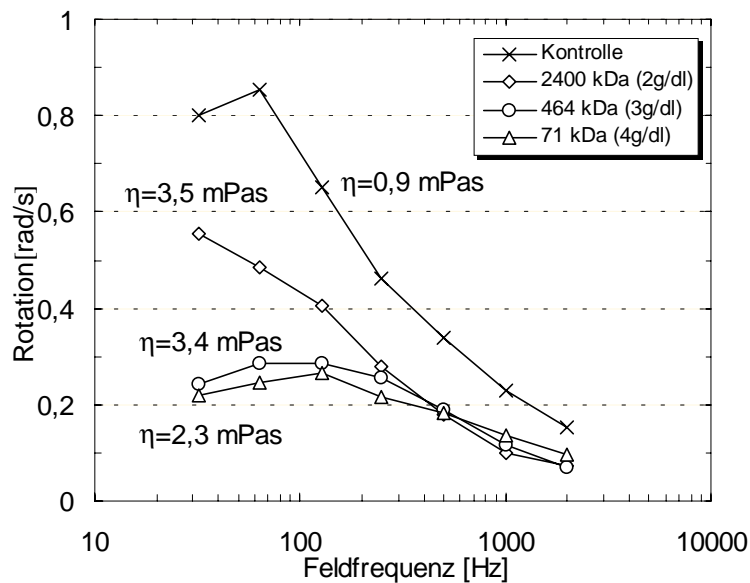


Bild 5.3: Vergleich von Elektrotationsspektren fixierter Erythrozyten in Natriumchlorid- und Dextranlösungen. Molekulargewichte und Konzentrationen werden in der Legende angegeben. Alle Rotationsspektren wurden bei einer Feldstärke von  $8 \cdot 10^3$  V/m und einer Leitfähigkeit von 2,1 mS/m aufgenommen. Die Standardabweichung lag zwischen 8 und 16 Prozent.

Auffällig ist im Bild 5.4, daß die Rotationsverhältnisse unterhalb von 100 Hz in den Lösungen mit 71 kDa und 464 kDa Dextran deutlich größer waren. Beim 71 kDa Dextran wurde sogar das Viskositätsverhältnis überschritten, d.h. die Rotation war langsamer als mit der erhöhten Viskosität klassisch zu erwarten wäre. Trotz dieses Widerspruches erkennt man deutlich den Einfluß des Depletioneffektes auf die Rotationsverhältnisse im Bereich der  $\alpha$ -Dispersion. Auch die in den elektrophoretischen Daten ermittelte Abhängigkeit von den Molekulargewichten läßt sich in der gleichen Reihenfolge im Bild 5.4 wiedererkennen.

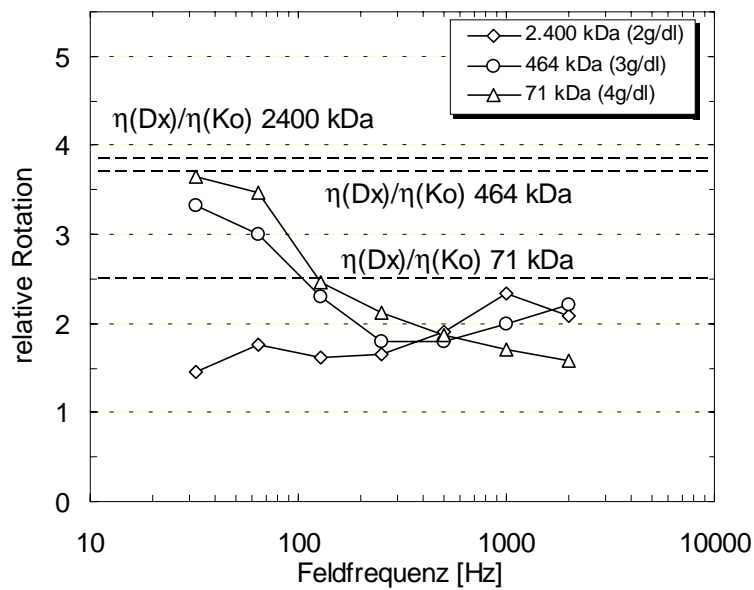


Bild 5.4: Verhältnisse der Rotationsgeschwindigkeiten aus Bild 5.3 in Dextranlösung zur Kontrolle. Die gestrichelten Linien geben die entsprechenden Viskositätsverhältnisse an.

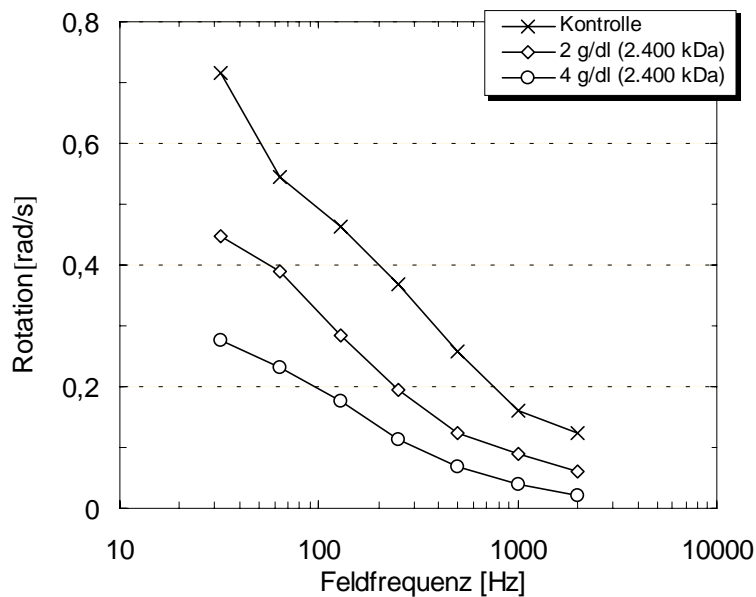


Bild 5.5: Vergleich von Elektorotationsspektren fixierter Erythrozyten in Natriumchloridlösung und Dextranlösung mit unterschiedlichen Konzentrationen von 2400 kDa Dextran. Die Rotationsspektren wurden bei einer Feldstärke von  $8 \cdot 10^3$  V/m und bei einer Leitfähigkeit von 3,9 mS/m aufgenommen.

In Bild 5.5 sind Elektrorotationsspektren im niederfrequenten Bereich zu sehen, bei denen die Konzentration von 2400 kDa Dextran variiert wurde. Die Spektren wurden bei einer Leitfähigkeit um 4.0 mS/m aufgenommen. Trotz einer fast vierfachen Viskosität der Lösung mit 2 g/dl Dextran gegenüber der Kontrolllösung und einer mehr als siebenfachen mit 4 g/dl Dextran sind die Rotationsgeschwindigkeiten im Durchschnitt über den gemessenen Frequenzbereich nur um einen Faktor von 1,8 (2 g/dl) und 3,2 (4 g/dl) reduziert. Im Bild 5.6 werden zur Verdeutlichung noch die relativen Rotationsspektren im Vergleich zu den Viskositäten der Lösungen dargestellt. Bei der verwendeten Ionenstärke beträgt die Debyelänge ungefähr 16nm.

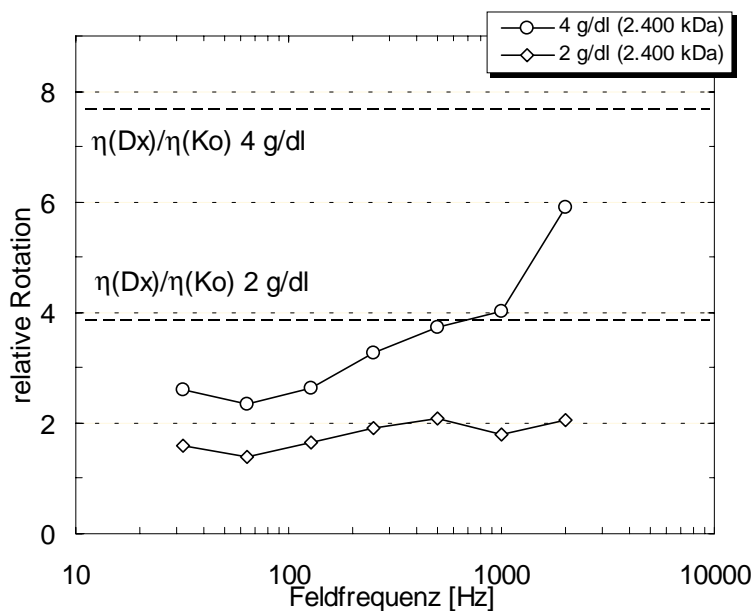


Bild 5.6: Verhältnisse der Elektrorotationsspektren aus Bild 5.5 in 2400 kDa Dextranlösung zur Kontrolle. Die gestrichelten Linien geben die entsprechenden Viskositätsverhältnisse an.

Im Bild 5.6 fällt außerdem der monotone Anstieg des Rotationsverhältnisses bei einer Konzentration von 4 g/dl mit zunehmender Feldfrequenz auf. Der Einfluß einer Depletionsschicht beim Übergang vom  $\alpha$ - zum  $\beta$ -Dispersionsbereich wird im Bild 5.7 in einem Frequenzbereich von 64 Hz bis 2 MHz dargestellt. Zu sehen ist das Verhältnis der Rotationsgeschwindigkeiten von fixierten Erythrozyten in einer Natriumchloridlösung zu dem in einer 2400 kDa Dextranlösung mit einer Konzentration von 2 g/dl. Die Spektren wurden bei einer externen Leitfähigkeit von 2,1 mS/m aufgenommen. Deutlich zu erkennen ist die Zunahme des Rotationsverhältnisses mit steigender Feldfrequenz bis in den Bereich von 10-100kHz

hinein. Von hier an rotieren die Erythrozyten innerhalb der Fehlergrenzen mit der nach der Viskosität zu erwartenden Geschwindigkeit. Diese Beobachtungen untermauern zum einen die Unabhängigkeit der  $\beta$ -Dispersion vom Depletionseffekt und zum anderen den deutlichen Zusammenhang zwischen der Depletionschicht und der Elektrorotation im  $\alpha$ -Dispersionbereich.

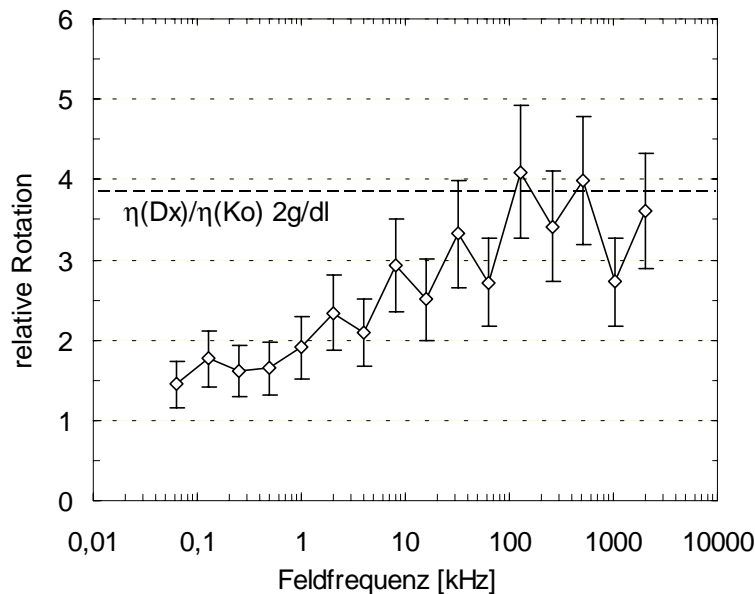


Bild 5.7: Verhältnis der Rotationsgeschwindigkeiten von fixierten Erythrozyten in Natriumchloridlösung zu denen in 2 g/dl Dextran 2400 kDa Lösung in Abhängigkeit von der externen Feldfrequenz. Die gestrichelte dicke Linie entspricht dem Viskositätsverhältnis. Die Daten wurden bei einer Leitfähigkeit von 2,1 mS/m und einer Feldstärke von  $8 \cdot 10^3$  V/m aufgenommen.

Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse zu verdeutlichen, soll zum Abschluß noch qualitativ die Energiedissipation von hydrodynamischen und elektroosmotischen Strömungen verglichen werden. Elektrokinetische Wechselwirkungen treten im Nanometerbereich auf. Im Gegensatz dazu reichen die hydrodynamischen Kräfte, die zum Beispiel durch die Wechselwirkung eines externen elektrischen Feldes auf den induzierten Dipol eines in einer Lösung befindlichen Partikels wirken, wesentlich weiter. Im Bild 5.8 wird dieser Sachverhalt an Hand zweier Geschwindigkeitsprofile dargestellt. Dazu wird von einer Oberfläche ausgegangen, an der die Geschwindigkeit null ist und von dort beginnend mit dem senkrechten Abstand zunimmt. Beim elektroosmotischen Profil wird der Grenzwert der Geschwindigkeit bei einem Abstand erreicht, der in der Größenordnung der Debye-Länge liegt. Das hydrodynamische Profil

nähert sich dagegen unabhängig von der Debye-Länge allmählich dem endgültigen Wert, welcher erst bei wesentlich größeren Abständen erreicht wird.

Im Bild 5.8 wird auch noch der Einfluß des verwendeten Polymers und der Ionenstärke der Lösung illustriert. Zu diesem Zweck sind qualitativ die Größen von zwei Depletionschichten und eine Debye-Länge eingezeichnet. Man erkennt für die illustrierten Fälle zum einen den Einfluß der Größe der Depletionschicht und zum anderen den Einfluß einer größer werdenden Debye-Länge. Im Falle der Elektrorotation im  $\alpha$ -Dispersionsbereich führt so eine Debye-Länge, die größer als die Depletionschicht ist, zu einem größeren Einfluß der Lösungsviskosität auf die Rotationsgeschwindigkeit.

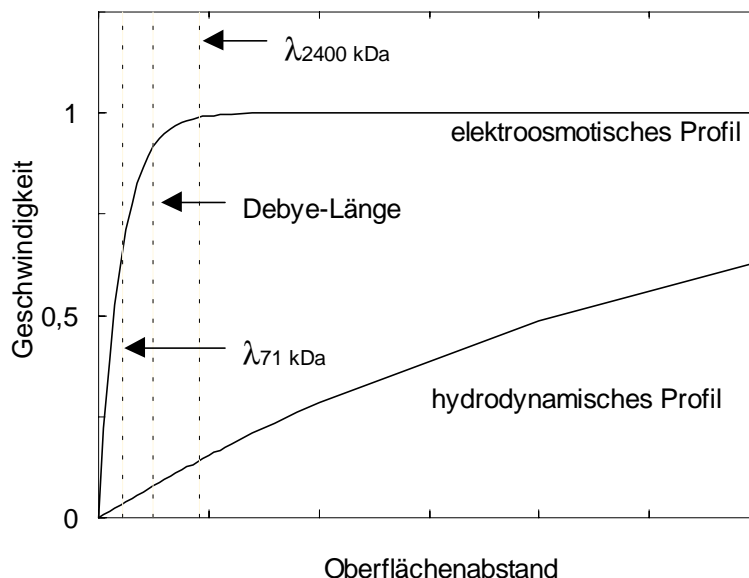


Bild 5.8: Qualitativer Vergleich eines elektroosmotischen und eines hydrodynamischen Geschwindigkeitsprofils in Abhängigkeit vom Abstand zur Oberfläche.  $\lambda_{2400 \text{ kDa}}$  und  $\lambda_{71 \text{ kDa}}$  markieren die Dicke der Depletionschicht für unterschiedliche Molekulargewichte des verwendeten Polymers.

### 5.3 Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Die experimentellen und theoretischen Resultate zeigen deutlich den Einfluß, den die Dextrandepletionschicht auf die Elektrorotation im Niederfrequenzbereich bei fixierten Erythrozyten hat. Im Gegensatz dazu existiert im Bereich höherer Frequenzen bzw. der  $\beta$ -Dispersion nur ein geringer oder gar kein Einfluß von Dextrandepletionschichten auf

das Elektrorotationsverhalten. Die experimentellen Ergebnisse dieses Kapitels bestätigen also die Vermutung, daß ein wesentlicher Anteil der Kräfte im  $\alpha$ -Dispersionsbereich elektroosmotischer Natur sein muß [58]. Besonders deutlich wird dies auch beim Übergang zu höheren Frequenzen.

Ein weiterer Einfluß, der vorerst hier nicht berücksichtigt wurde, ist die Adsorption von Polymeren. Sicher wird auch dies Einfluß auf die Diffusionszeiten der Ionen und somit auf den Verlauf der Spektren haben. Damit die Elektrorotation aber zu einem geeigneten Instrument beim Untersuchen von Polymerdepletion und –adsorption werden kann, müssen noch theoretische Hindernisse genommen werden. Zum einen wird eine Verallgemeinerung auf haarige Oberflächen benötigt, die auch den Einfluß ortsabhängiger Viskositätsprofile berücksichtigt. Mit einem derartigen Modell wäre eine quantitative Interpretation der dargestellten Erythrozytenspektren in Dextranlösungen möglich. Außerdem muß geklärt werden, inwieweit sich die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Dispersion beeinflussen und in einer Theorie vereinigt werden können.

Die Elektrorotation könnte gegenüber der Elektrophorese erhebliche experimentelle Vorteile für die Bestimmung von Depletionseffekten aufweisen. Bei der Elektrophorese muß die Debye-Länge variiert werden, um die Ausmaße der Depletionschicht zu bestimmen. Bei der Rotation könnte hingegen die Variation der Feldfrequenz ausreichen, um z.B. beim Übergang vom  $\alpha$ - zum  $\beta$ -Gebiet die Ausmaße und das Viskositätsprofil einer Depletionschicht zu bestimmen.



## **6 Polyelektrolytdepletion und -adsorption bei Erythrozyten**

Dieses Kapitel beschäftigt sich im wesentlichen mit der Wechselwirkung zwischen Polyelektrolyten und der Erythrozytenmembran. Im ersten Abschnitt werden elektrophoretische Daten von nativen Erythrozyten in unterschiedlichen Polystyrensulfonat (PSS) Lösungen vorgestellt, die Rückschlüsse auf das Adsorptions- und Verdrängungsverhalten dieser Polymere zulassen. Der zweite Teil widmet sich der Adsorption von Polyelektrolyten an fixierten Erythrozyten und der Möglichkeit Polyelektrolytkapseln mit biologischen Templaten herzustellen.

### **6.1 Depletion und Adsorption von PSS an nativen Erythrozyten**

Im Bild 6.1 sind die elektrophoretischen Mobilitäten nativer Erythrozyten in PSS Lösungen mit unterschiedlichen Molekulargewichten zu sehen. Die Polymerkonzentration betrug immer 1 g/dl und die Ionenstärke 150 mM. In den PSS Lösungen wurde die Ionenstärke durch angleichen der Leitfähigkeit an die der Kontrolllösung ohne PSS durch Zugabe von NaCl erreicht. Die Angaben der Salzkonzentrationen in den PSS-Lösungen stellen insofern durch den Beitrag der PSS-Moleküle zur Leitfähigkeit nur angenähert die NaCl Konzentration dar. Als erstes erkennt man, daß mit zunehmendem Molekulargewicht auch die Mobilität zunahm. Wie in Tabelle 6.1 zu sehen, ist mit dem Molekulargewicht der Polymere auch die Viskosität gewachsen. Bei einem Molekulargewicht von 48,7 kDa lag diese mit 0,97 mPas nur geringfügig über der Kontrolllösung ohne PSS und erreichte bei 2613 kDa 14,5 mPas. Zunächst wurde von dem linearen Zusammenhang zwischen dem Produkt aus der Mobilität und der Viskosität mit dem  $\zeta$ -Potential ausgegangen, wie es nach Smoluchowski zu erwarten ist. Im Bild 6.1 sind diese theoretischen  $\zeta$ -Potentiale in Abhängigkeit vom Molekulargewicht eingetragen. Man erkennt einen dramatischen Zuwachs mit zunehmendem Molekulargewicht. Im Vergleich zum Kontrollwert ist das  $\zeta$ -Potential in der Lösung mit 1 g/dl des 2613 kDa PSS von 13,1 mV auf 618 mV angewachsen. Die extrem hohen theoretischen Werte des  $\zeta$ -Potentials legen nahe, daß

die Versuche außerhalb des Gültigkeitsbereiches der Gleichung von Smoluchowski lagen. An dem Mobilitätszuwachs den die Erythrozyten in den PSS-Lösungen erfahren, läßt sich vermuten, daß eine Adsorption der negativ geladenen PSS-Moleküle stattfindet.

In Lösungen mit Polyelektrolyten können sich wie bei neutralen Polymeren Depletionschichten ausbilden. Bei neutralen Polymeren führt die Abnahme der Konfigurationsentropie der Polymere nahe der Grenzfläche zur Ausbildung einer Depletionschicht, wenn sie nicht durch eine positive Wechselwirkungsenergie ausgeglichen wird. Als zusätzlicher Faktor tritt bei geladenen Polymeren noch die elektrostatische Wechselwirkung hinzu [13,46]. Wie bereits im Kapitel 3.2 erläutert kann ein Polymerdepletionseffekt zu einer reduzierten Viskosität innerhalb der Doppelschicht führen, wodurch der lineare Zusammenhang zwischen der Lösungsviskosität und dem  $\zeta$ -Potential verloren geht. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen deutlich für einen Depletionseffekt.

Interessant ist auch, daß mit zunehmendem Molekulargewicht offensichtlich mehr Ladungen an die Oberfläche des Erythrozyten gebunden werden, obwohl die Monomerkonzentration in den Lösungen konstant bleibt. Die Adsorption von PSS war völlig reversibel und die Moleküle konnten ohne Probleme durch Waschen der Erythrozyten in gepufferter isotoner NaCl Lösung wieder entfernt werden.

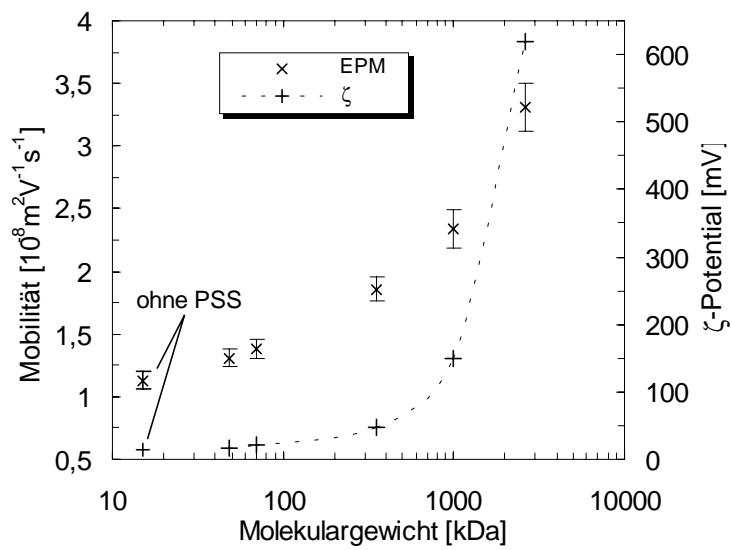


Bild 6.1: Elektrophoretische Mobilität (EPM) von menschlichen Erythrozyten in PSS-Lösungen bei einer Ionenstärke von 150mM (pH=7,4) und einer PSS Konzentration von 1g/dl in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des Polymers sowie die dazugehörigen  $\zeta$ -Potentiale (nach Smulochowski).

Tabelle 6.1: Zusammenfassung der Parameter zum Bild 6.1 ( $M_w$ : mittleres Molekulargewicht;  $\mu$ : Mobilität;  $\eta$ : Viskosität;  $\zeta$ :  $\zeta$ -Potential (nach Smulochowski).

$M_w$ [kDa]	0	48,6	70	350	990	2613
$\mu$ [ $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	1,13	1,31	1,38	1,86	2,34	3,31
$\eta$ [mPs]	0,9	0,97	1,21	2,0	4,95	14,5
$\zeta$ [mV]	13,1	16,4	21,5	48	149	618

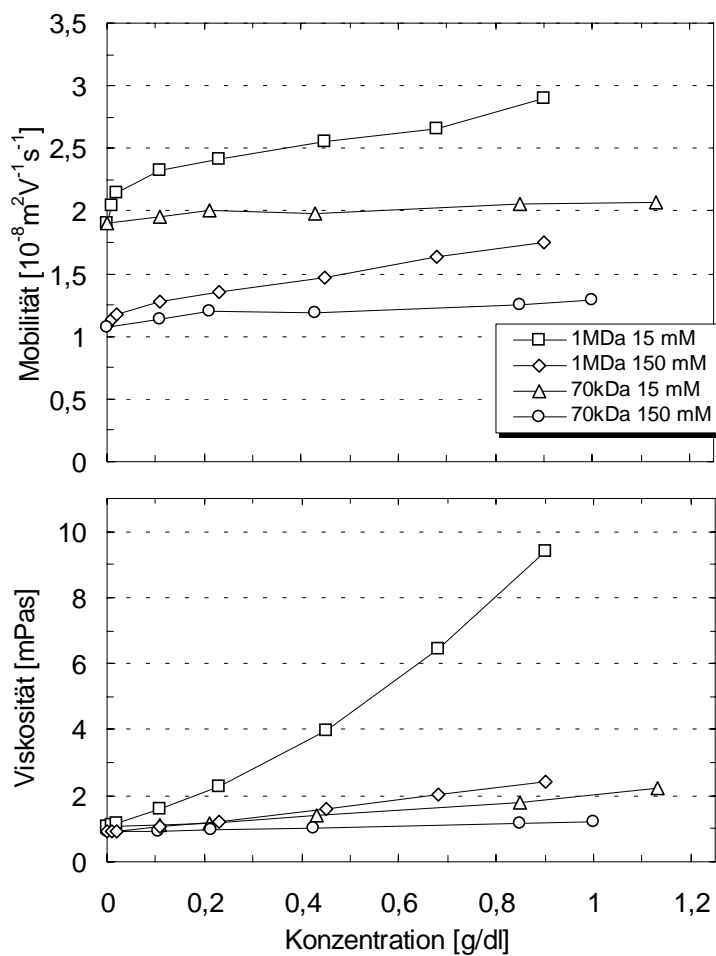


Bild 6.2: Elektrophoretische Mobilität von nativen Erythrozyten in isotonen PSS-Lösungen mit unterschiedlichen Ionenstärken (Angabe in der Legende in mM NaCl, pH = 7,4) und Molekulargewichten in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Standardabweichung lag bei 5-15 %. Im unteren Bild sind die Viskositäten aufgetragen.

Im Bild 6.2 ist die Abhängigkeit der Mobilität von nativen Erythrozyten von der PSS Konzentration und der verwendeten Ionenstärke zu sehen. Im unteren Teil werden die Viskositäten dargestellt. Es wurden PSS Lösungen mit 70 kDa und 1000 kDa verwendet. Die Ionenstärke betrug jeweils 15 mM und 150 mM NaCl. Obwohl die Viskositäten der PSS-Lösungen mit der Konzentration anstiegen, nahmen gleichzeitig die Mobilitäten deutlich zu. Außer der insgesamt etwas höheren Mobilität bei niedrigen Ionenstärken scheint die Zunahme im wesentlichen linear von der PSS Konzentration abzuhängen. Die Ionenstärke scheint keinen allzu großen Einfluß auf den absoluten Zuwachs zu haben. Dies ist insofern bemerkenswert, als die Viskosität bei geringerer NaCl Konzentration nochmals signifikant angestiegen war.

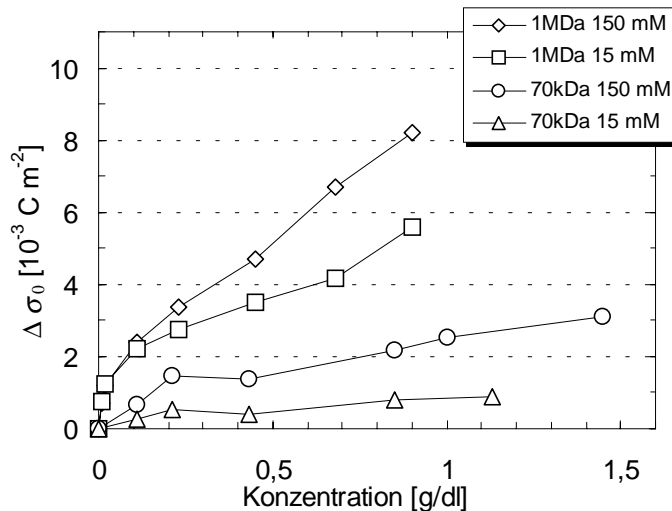


Bild 6.3: Absolute Ladungszunahme an der Zelloberfläche nativer Erythrozyten in PSS Lösungen in Abhängigkeit von der PSS Konzentration, dem Molekulargewicht sowie der Ionenstärke. Zur Berechnung wird von einem glatten sphärischen Partikel ausgegangen und die Viskosität der Lösungen vernachlässigt (siehe Gleichung (3.42)). Ohne PSS beträgt die Oberflächenladung bei 150 mM NaCl und 15 mM NaCl jeweils  $12,6 \text{ mC/m}^2$  und  $8,7 \text{ mC/m}^2$ .

Um die Adsorptionsisothermen von PSS an der Erythrozytenoberfläche zu diskutieren, wird im folgenden davon ausgegangen, daß die Ausmaße der Depletionsschicht die der Doppelschicht überschreiten. Die Viskosität innerhalb der Doppelschicht wurde gleich der Kontrolllösung gesetzt. Im Bild 6.4 und Bild 6.3 ist jeweils die Zunahme der Oberflächenladung  $\Delta\sigma$  der Erythrozyten in den PSS Lösungen aus Bild 6.1 und Bild 6.2 dargestellt. Zur Berechnung der Ladungen wurde von einer Kugel mit einer glatten Oberfläche ausgegangen, die Struktur der Erythrozytenoberfläche also nicht berücksichtigt. Die angegebenen Ladungen lassen daher keine Rückschlüsse auf die absolute Adsorption zu. Vielmehr handelt es sich um effektive Ladungszunahmen, die sich untereinander vergleichen lassen.

Wie nach den Mobilitäten aus Bild 6.2 zu erwarten, nahmen die Oberflächenladungen in allen Lösungen (Bild 6.3) stetig mit der Konzentration zu, wobei der Zuwachs in den Lösungen mit dem 1 MDa PSS noch deutlich größer war. Beim höhermolekularen PSS war bei geringeren Konzentrationen noch ein etwas steilerer Anstieg zu beobachten. Sowohl beim 70 kDa als auch beim 1 MDa lagen die Oberflächenladungen in den Lösungen größerer Ionenstärke immer etwas höher. Geringere Ionenstärken führten allerdings in den PSS-Lösungen zu größeren Viskositäten (Bild 6.2) und die Debye-Länge ist von knapp 0,8 nm bei 150 mM auf 2,5 nm bei 15 mM angewachsen. Folglich

muß es sich bei größeren Ionenstärken nicht um eine höhere adsorbierte Ladungsmenge und somit um eine von der Ionenstärke abhängige Adsorption handeln. Eine andere Möglichkeit wäre auch, daß sich bei niedrigen Ionenstärken doch noch ein stärkerer Einfluß der Viskosität auf die Mobilität bemerkbar macht.

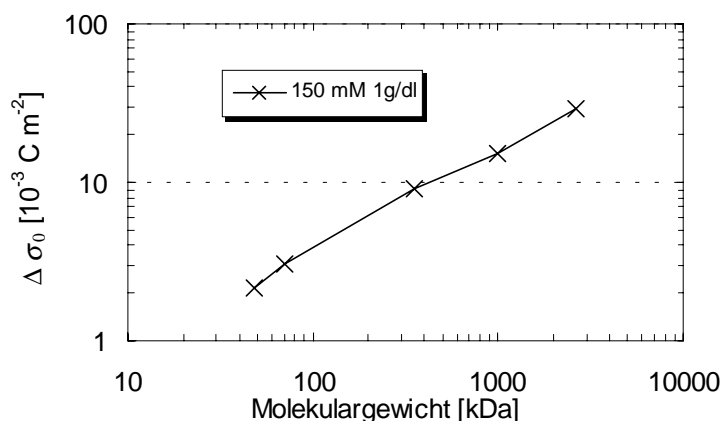


Bild 6.4: Absolute Ladungszunahme an der Zelloberfläche nativer Erythrozyten in PSS Lösungen in Abhängigkeit vom Molekulargewicht. Zur Berechnung wird von einem glatten sphärischen Partikel ausgegangen und die Viskosität der Lösungen vernachlässigt. Ohne PSS beträgt die Oberflächenladung in  $13,2 \text{ mC/m}^2$ .

In den Lösungen mit 1 MDa PSS fiel auf, daß bei geringer Konzentration die Ladungszunahmen noch identisch sind und erst ab 0,3g/dl auseinander laufen. Mit zunehmender Polymerkonzentration nimmt aber auch die Depletionlänge ab. Auch dies könnte eine Ursache für eine geringere Mobilität und den scheinbar geringeren Ladungszuwachs erklären. Andererseits wächst das Viskositätsverhältnis der 15mM Lösung zur 150mM Lösung von der kleinsten verwendeten Konzentration 0,01g/dl bis zur größten 0,9g/dl von 1,23 auf 3,9. Ein Einfluß der Viskosität sollte sich daher bei höheren Konzentrationen deutlicher bemerkbar machen. Bezüglich der größeren Debye-Länge bei niedrigen Ionenstärken muß auch darauf hingewiesen werden, daß bei geladenen Polymeren mit abnehmender Ionenstärke auch die Depletionlänge zunimmt [46]. Dies liegt an den repulsiven elektrostatischen Kräfte zwischen den geladenen Polymeren, die mit abnehmender Ionenstärke zunehmen, weil die Ladungen weniger stark abgeschirmt werden. Im vorliegenden Fall wird dieser Prozeß gewissermaßen der Zunahme der Debye-Länge entgegenwirken. Bezüglich der Ladungszuwächse bei geringen Konzentrationen muß auch darauf hingewiesen werden, daß diese im Bereich der Standardabweichung liegen und daher keine eindeutigen Schlüsse zulassen.

Wie im Kapitel 5 demonstriert, kann eine Depletionschicht, die durch neutrale Polymerere verursacht wird, durch Variation der Debye-Länge vermessen werden. Bei geladenen Polymeren ist dies nicht mehr möglich, weil die Ionenstärke auch die Depletionschichtdicke beeinflusst.

Im Bild 6.4 ist die absolute Ladungszunahme in Abhängigkeit vom Molekulargewicht zu sehen. Wie bereits nach den Mobilitäten in Bild 6.1 zu erwarten, wächst die adsorbierte Ladungsmenge deutlich mit dem Molekulargewicht.

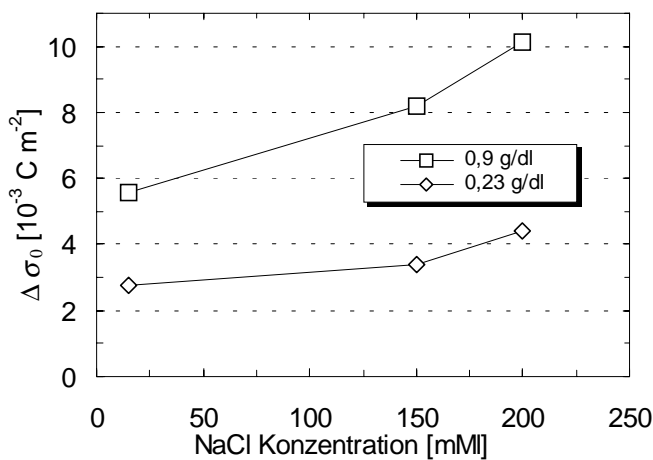


Bild 6.5: Absolute Ladungszunahme an der Zelloberfläche nativer Erythrozyten in PSS Lösungen in Abhängigkeit von der Ionenstärke bei zwei 1 MDa PSS Konzentrationen. Zur Berechnung wird von einem glatten sphärischen Partikel ausgegangen und die Viskosität der Lösungen vernachlässigt. Ohne PSS beträgt die Oberflächenladung: 13,7 mC/m² bei 200 mM, 12,6 mC/m² bei 150 mM NaCl und 8,7 mC/m² bei 15 mM NaCl.

Im Bild 6.5 ist für zwei Polyelektrolytkonzentrationen (1 MDa PSS) die Abhängigkeit der (vermeintlichen) Adsorption an der Erythrozytenoberfläche von der Ionenstärke zu sehen. Wie oben beschrieben wurden zur Berechnung die Viskosität und die haarige Oberflächenstruktur vernachlässigt. Deutlich zu erkennen ist die mit zunehmender Ionenstärke zunehmende Ladungsdifferenz.

Insgesamt läßt sich festhalten, daß die Desorption der Polymere eine eher schwache Physisorption durch van der Waals Kräfte nahe legt. Dies wäre auch im Einklang mit der Konzentrationsabhängigkeit. Die Abhängigkeit der Adsorption von der Ionenstärke wird dann in der stärkeren repulsiven Wechselwirkung zwischen den Polyelektrolyten untereinander bei geringeren Ionenstärken begründet liegen [46]. Bei sehr geringen PSS Konzentrationen könnte diese Wechselwirkung dann keine Rolle mehr spielen, wie es

in den Lösungen mit 1 MDa PSS beobachtet wurde (Bild 6.3). Hier war die Ladungszunahme anfangs unabhängig von der Ionenstärke.

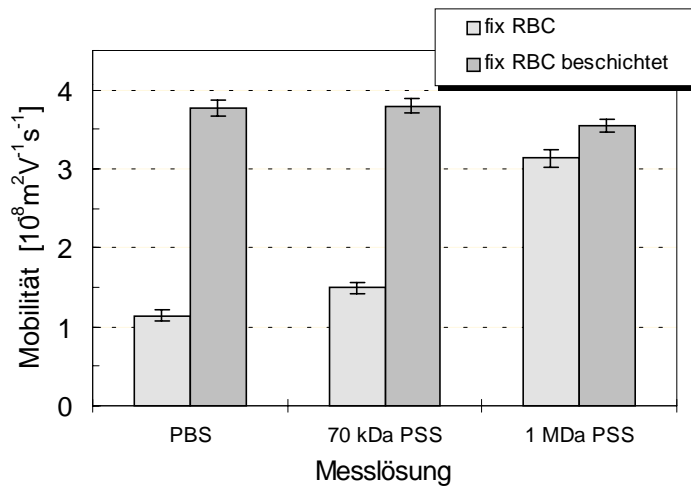


Bild 6.6: Mobilität von fixierten Erythrozyten und mit mehreren Polyelektrolytschichten beschichteten Erythrozyten (siehe Abschnitt 6.2) in gepufferter NaCl (150 mM) Lösung (PBS) und mit jeweils 1 g/dl 70 kDa und 1 g/dl 1 MDa PSS.

Im Bild 6.6 werden die Mobilitäten von fixierten Erythrozyten und von fixierten Erythrozyten mit mehreren Schichten aus konsekutiv adsorbierten Polyelektrolyten dargestellt, wobei die letzte Schicht aus 70 kDa PSS bestand. Auf die Beschichtung wird detailliert in Abschnitt 6.2 eingegangen. Für das vorliegende Problem ist nur entscheidend, daß die beschichteten Erythrozyten in der Kontrollösung und in den beiden PSS Lösungen (jeweils 1 g/dl 70 kDa und 1 MDa) ungefähr die gleiche Mobilität hatten. Dies legt zum einen die Vermutung nahe, daß kein weiteres PSS mehr an die Oberfläche gebunden wird. Außerdem bestätigt sich die Annahme einer Polymerdepletionschicht, die von ihren Ausmaßen deutlich die Debye-Länge überschreitet.

## 6.2 Erythrozyten als Template zur Herstellung von Polyelektrolytkapseln

Der erste Schritt bei der Herstellung von Polyelektrolytkapseln auf der Grundlage von fixierten Erythrozyten ist die konsekutive Adsorption von entgegengestzt geladenen Polyelektrolyten. Da das Oberflächenpotential von fixierten Erythrozyten negativ ist, wird bei der konsekutiven Beschichtung mit positiv geladenem



Polyallylaminehydrochlorid (PAH) begonnen, gefolgt von negativ geladenem Polystyrensulfonat (PSS). Im Bild 6.7 ist die elektrophoretische Mobilität von fixierten Erythrozyten in Abhängigkeit von der Anzahl der adsorbierten Polyelektrolytschichten dargestellt. Nach der ersten PAH Schicht ist die Mobilität der Erythrozyten noch negativ und nur um ca. ein Drittel geringer als bei den Kontrollzellen. Erst ab der zweiten PAH Schicht ( $[\text{PAH/PSS}]_1\text{PAH}$ ) wird die Mobilität positiv, kehrt sich also durch die adsorbierten PAH Polymere um. Ab der dritten PAH-Schicht ( $[\text{PAH/PSS}]_2\text{PAH}$ ) werden die Mobilitäten nahezu unabhängig von der Anzahl der darunterliegenden Schichten. Bei der PSS-Adsorption ist die Ausbildung der negativen Schichten von Anfang an wesentlich deutlicher zu erkennen. Verglichen mit den Kontrollzellen führt die erste PSS-Schicht ( $[\text{PAH/PSS}]_1$ ) zu einer doppelt so hohen negativen elektrophoretischen Mobilität. Ähnlich wie bei den PAH-Schichten läuft die Mobilität in eine Sättigung, die aber bis zur fünften PSS-Schicht ( $[\text{PAH/PSS}]_5$ ) scheinbar nicht ganz erreicht wird.

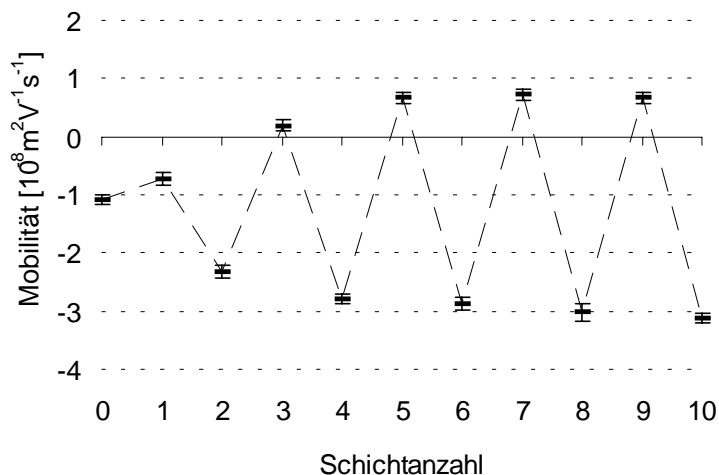


Bild 6.7: Elektrophoretische Mobilität von fixierten Erythrozyten mit konsekutiven PAH- und PSS-Schichten in einer gepufferten NaCl-Lösung (PBS). Eine ungerade Schichtanzahl bedeutet, daß die äußerste Schicht PAH ist ( $[\text{PAH/PSS}]_x\text{PAH}$ ) und eine gerade Anzahl heißt, daß die letzte Schicht PSS ist ( $[\text{PAH/PSS}]_x$ ).

Bei der Adsorption der gleichen Polyelektrolyte auf geladenen Latexpartikeln [29] wurde dagegen festgestellt, daß mit jeder Schicht ein Vorzeichenwechsel der Mobilität bzw. des  $\zeta$ -Potentials unabhängig von der Anzahl der Schichten stattfindet. Dieser Unterschied wird an der komplizierteren Oberflächenstruktur der Erythrozyten liegen.

Bei Erythrozyten sind die Oberflächenladungen in einer Schicht von mehreren Nanometern Dicke verteilt [26,27,93]. Vermutlich werden diese nach den ersten Schichten noch nicht völlig abgedeckt.

Um sicher zu gehen, daß es sich um ein Schichtwachstum handelt ohne den Austausch oder Verlust von Polyelektrolyten wurden noch Floreszenzmessungen durchgeführt. Dazu wurden auf die beschichteten Erythrozyten nach der zehnten Schicht noch weitere mit floreszenzmarkiertem (FITC) PAH (mPAH) aufgebracht. Diese Zellen wurden anschließend mit einem Durchflußzytometer untersucht. Im Bild 6.8 sind die Intensitätssignale von Zellen mit 12 ( $[\text{PAH/PSS}]_5[\text{mPAH/PSS}]_1$ ), 14 ( $[\text{PAH/PSS}]_5[\text{mPAH/PSS}]_2$ ) und 16 ( $[\text{PAH/PSS}]_5[\text{mPAH/PSS}]_3$ ) Schichten zu sehen. Die Zunahme des Floreszenzsignales ist nahezu proportional zur Anzahl der Schichten aus FITC markiertem PAH.

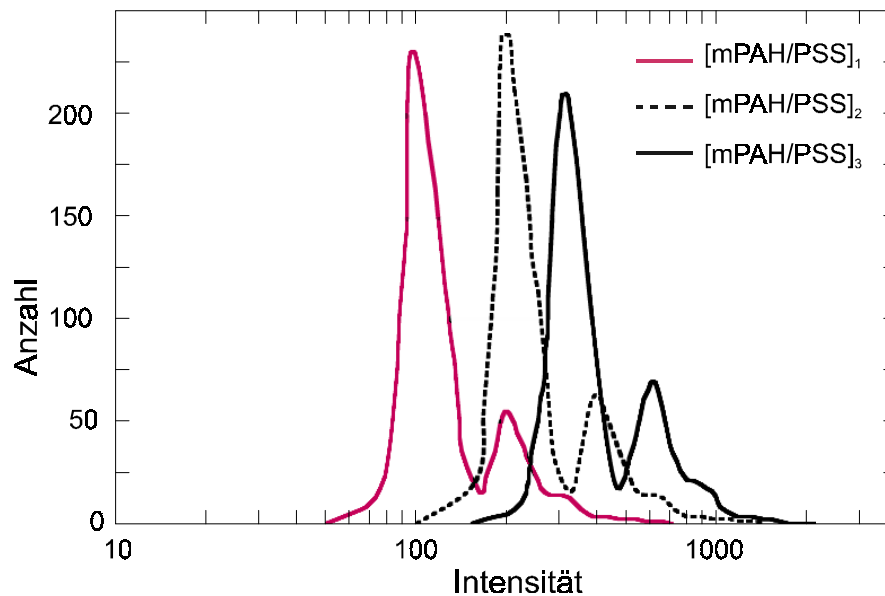


Bild 6.8: Intensitätsverteilung des Floreszenzsignales aufgenommen mit einem Flowcytometer. Zu sehen sind die Signale von drei aufeinander folgenden FITC markierten PAH-Schichten (mPAH), die auf fixierte Erythrozyten mit bereits 10 Schichten  $[\text{PAH/PSS}]_5$  aufgebracht wurden.

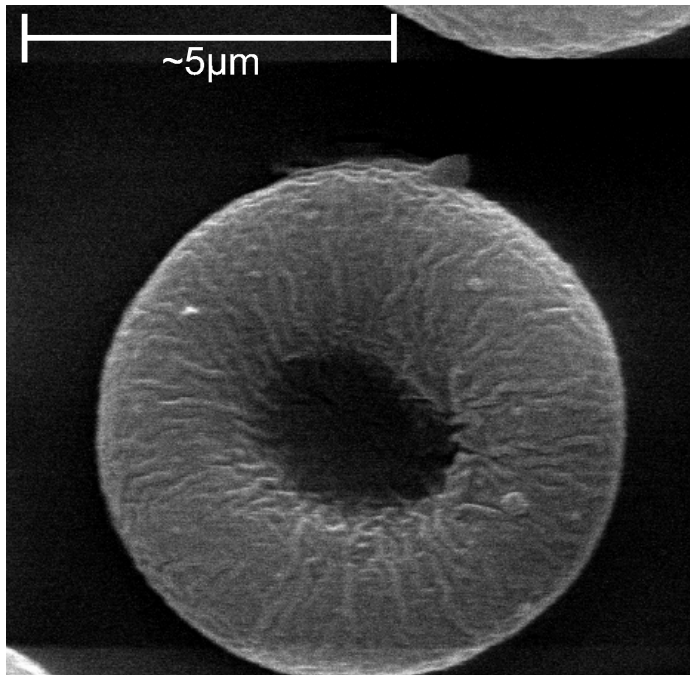


Bild 6.9: SEM-Aufnahme eines fixierten Erythrozyten mit 10 Polyelektrolytschichten ([PAH/PSS]<sub>5</sub>).

Im Bild 6.9 ist eine Aufnahme mit einem Rasterelektronenmikroskop (SEM) von einem fixierten Erythrozyten mit 10 Polyelektrolytschichten zu sehen. Die regelmäßigen Deformationen sind Präparationsartefakte aufgrund der notwendigen Trocknung des Präparates. Die Erythrozyten schrumpfen dabei stärker als die Polyelektrolythüllen. Dieser Prozeß macht dann die wenige Nanometer dünnen Polyelektrolytschichten in dem SEM Bild überhaupt erst sichtbar.

Im Bild 6.10 wird die Herstellung von Polyelektrolytkapseln noch einmal schematisch dargestellt. Nach der Adsorption einer ausreichenden Anzahl von Schichten erfolgt die Behandlung mit einer NaOCl-Lösung zum Zersetzen der Proteine. Die zerstörten Proteine können aus den Polyelektrolytkapseln heraus diffundieren. Durch anschließendes Waschen der Suspension werden die Kapseln von den Proteinresten getrennt.

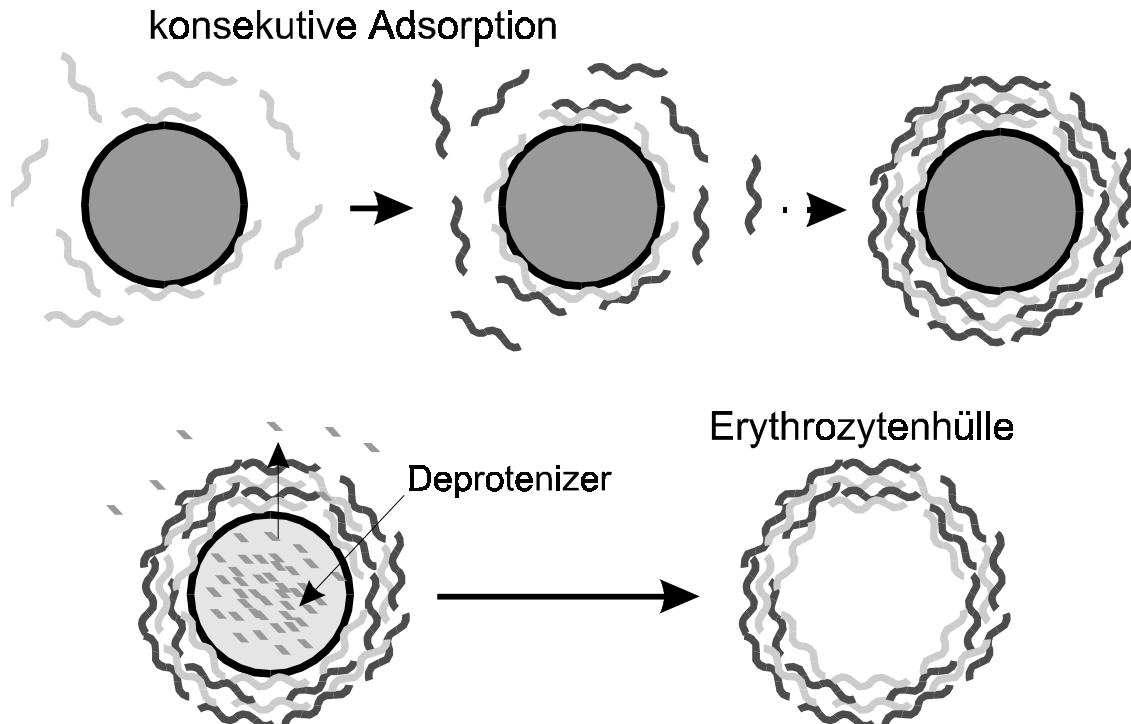


Bild 6.10: Schematische Darstellung der konsequenten Beschichtung mit Polyelektrolyten sowie der anschließenden Auflösung von fixierten Erythrozyten bei der Verwendung als Template für die Herstellung von Polyelektrolytkapseln.

Im Bild 6.11 ist eine Folge von Aufnahmen eines Transmissionselektronenmikroskopes (TEM) zu sehen. Im ersten Bild (a) wird der Schnitt durch Erythrozyten dargestellt und im zweiten (b) durch Erythrozyten mit 10 Polyelektrolytschichten. Das letzte Bild (c) zeigt den Schnitt durch eine Polyelektrolythülle, wie sie nach dem Auflösen der Proteine von beschichteten Erythrozyten übrig bleibt. Beim Vergleich der beschichteten Zellen mit den unbeschichteten erkennt man deutlich die Polyelektrolytschicht. Auffällig an der Polyelektrolytkapsel im Bild 6.11c ist, daß sie keinerlei Hinweis auf Löcher oder Risse liefert. Im Rahmen der Auflösung erscheinen die Schichtdicken in b) und c) sehr gleichmäßig. Weiterhin fällt bei der Polyelektrolythülle noch auf, daß sie in ihrer Form nicht allzu sehr von der eines Erythrozyten abweicht. Die Hülle zeigt aufgrund der Einbettung bei der Zubereitung des Präparates für die TEM-Messungen eine vom ursprünglichen Erythrozyten abweichende Form, da während dieses Prozesses starke mechanische Kräfte auf die Hüllen einwirken. So waren die Schnitte der Kapseln zum Teil recht stark deformiert, allerdings ohne Risse oder ähnliches aufzuweisen.

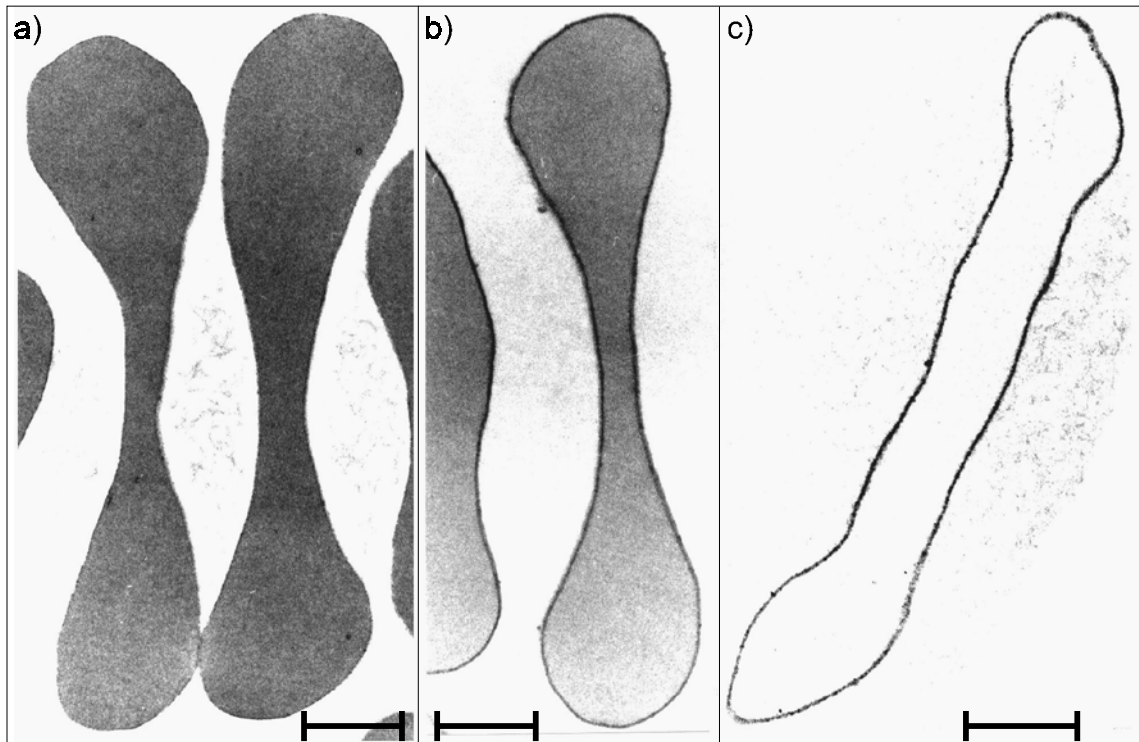


Bild 6.11: TEM-Aufnahmen a) fixierter Erythrozyten, b) fixierter Erythrozyten mit 10 Polyelektrolytschichten und c) einer Polyelektrolythülle (10 Schichten) nach dem Zersetzen der Zelle. Die Balken entsprechen jeweils 1 µm.

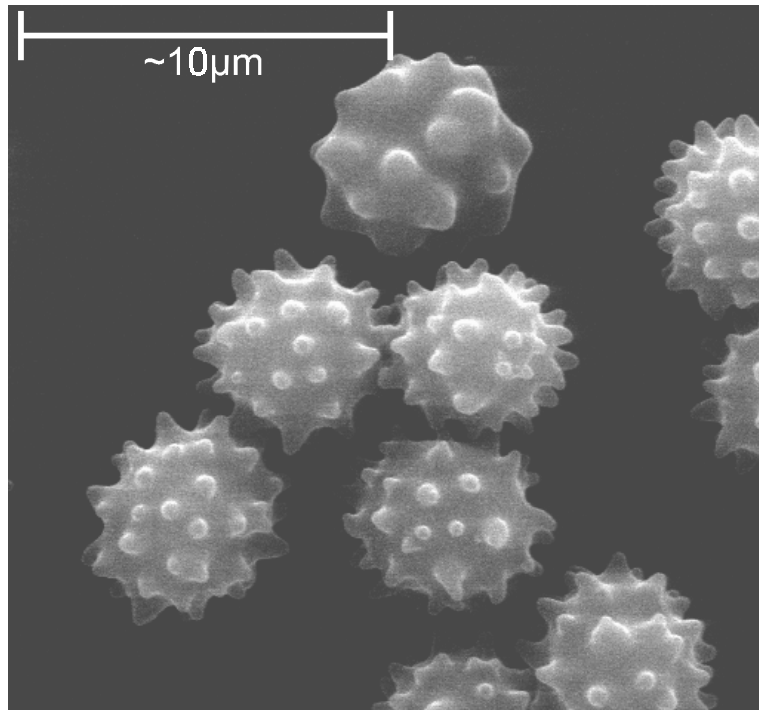


Bild 6.12: SEM-Aufnahme fixierter Echinozyten mit 10 Polyelektrolytschichten ([PAH/PSS]<sub>5</sub>).

Im Bild 6.12 ist eine SEM Aufnahme von beschichteten Echinozyten zu sehen. Um Echinozyten zu fixieren, wurden Erythrozyten unmittelbar vor der Fixierung mit Acetylsalicylsäure behandelt (Kapitel 2.2.2). Die Beschichtung mit Polyelektrolyten konnte dann genauso erfolgen wie bei den Discozyten. In der SEM Aufnahme läßt sich noch kein Hinweis auf die adsorbierten Polyelektrolytschichten erkennen. Im Bild 6.13 und im Bild 6.14 sind Aufnahmen mit einem Kraftmikroskop (AFM) von durch Trocknung zusammengefallenen Polyelektrolytkapseln zu sehen. Im Bild 6.13 dienten Discozyten als Templat und im Bild 6.14 Echinozyten. Bei den Discozyten sind nur recht wenige Falten und Unregelmäßigkeiten zu erkennen. Die Kapseln die mit Echinozyten hergestellt wurden, weisen dagegen wesentlich deutlichere Strukturen auf, die sich eindeutig auf die Spitzen der Echinozyten zurückführen lassen.

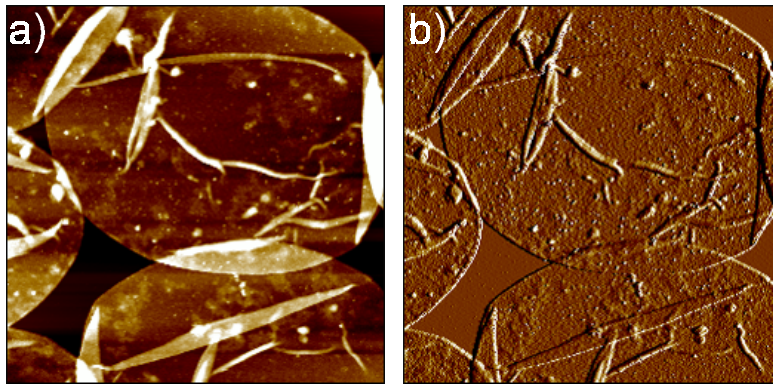


Bild 6.13: AFM-Aufnahmen ( $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ ) von Polyelektrolytschalen mit Erythrozyten als Vorlage (10 Schichten): a) Höhenprofil bei konstantem Sonden-Oberflächen-Abstand (0-100nm), b) Spannungsprofil bei konstanter Amplitude ( $\Delta U=0,2\text{V}$ ).

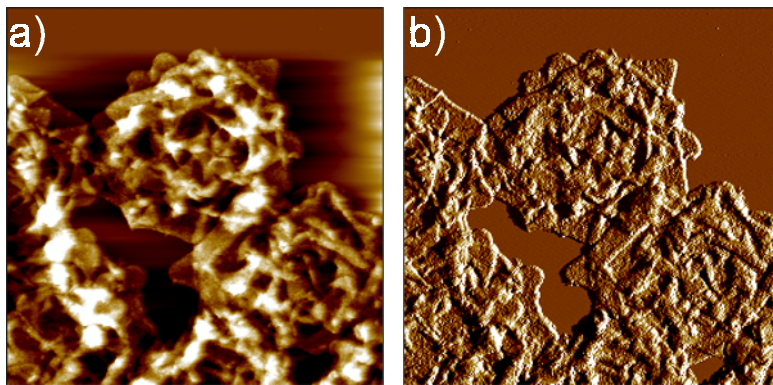


Bild 6.14: AFM-Aufnahmen ( $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ ) von Polyelektrolytschalen mit Echinozyten als Vorlage (10 Schichten): a) Höhenprofil bei konstantem Sonden-Oberflächen-Abstand (0-150nm), b) Spannungsprofil bei konstanter Amplitude ( $\Delta U=0,2\text{V}$ ).

Wesentlich besser lassen sich die Formen der Hüllen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie darstellen. Die Auflösung ist zwar deutlich geringer, aber die Hüllen lassen sich in wässrigen Lösungen betrachten. Auf diese Weise wird die mechanische Beanspruchung wesentlich geringer gehalten und ein Zusammenfallen der Kapseln vermieden. Im Bild 6.15 ist eine Folge von konfokalen Aufnahmen von Polyelektrolytschalen mit der Form von Echinozyten zu sehen. Um die Hüllen sichtbar zu machen, besteht die äußerste Schicht aus FITC markiertem PAH ( $[\text{PAH}/\text{PSS}]_5\text{mPAH}$ ). Die Schnittebenen liegen  $1\mu\text{m}$  auseinander. Die Form der Hüllen spiegelt im Rahmen der Auflösung ohne Einschränkung die der Echinozyten wieder.

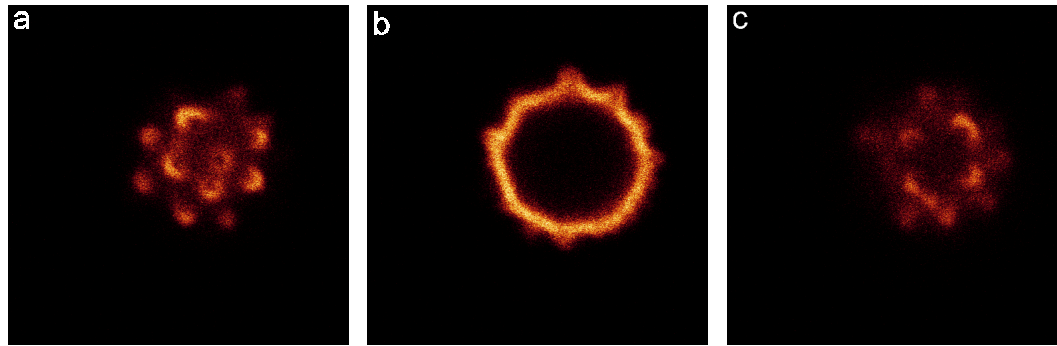


Bild 6.15: Konfokale Rasteraufnahmen ( $16\text{ }\mu\text{m} \times 16\text{ }\mu\text{m}$ ) einer Polyelektrolytschale aus 11 Schichten, die aus Echinozyten hergestellt wurde. Die äußerste Schicht besteht aus FITC markiertem PAH. Der Abstand der Scanebenen beträgt  $1\text{ }\mu\text{m}$ .

### 6.3 Aussichten und Zusammenfassung

Im ersten Teil dieses Kapitels wurden Ergebnisse von nativen Erythrozyten in verschiedenen PSS-Lösungen vorgestellt. Es zeigte sich, daß PSS zum einen reversibel adsorbiert und zum anderen einen deutlichen Depletionseffekt herbeiführt. Mit den elektrophoretischen Messungen war es möglich das Adsorptionsverhalten von geladenen Polymeren in Anwesenheit dieser Polymere an Partikeloberflächen zu untersuchen. Bei der Interpretation der vorliegenden Untersuchungen wurde von einer glatten Sphäre ausgegangen. Weiterhin wurde ein Einfluß der Polymere auf die Viskosität in der Doppelschicht vernachlässigt. Die experimentellen Ergebnisse legen diese zweite Vereinfachung durch die zum Teil extrem hohen Viskositäten bei gleichzeitig extrem hohen Mobilitäten nahe. Um allerdings zu quantitativen Aussagen zur Adsorption zu gelangen, wird in Zukunft an weiteren theoretischen Ansätzen gearbeitet werden müssen. So muß in der Theorie sowohl ein Depletionseffekt inklusive der elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb der Polymere berücksichtigt werden, als auch die haarige Struktur der Zelloberfläche, wie sie bei Erythrozyten vorliegt.

Im zweiten Teil dieses Kapitels wurde die Möglichkeit vorgestellt, Schichten aus Polyelektrolyten auf die Oberfläche fixierter Erythrozyten aufzubringen. Anschließend wurden die Zelle aufgelöst, wodurch die Herstellung von Polyelektrolytkapseln mit Erythrozyten als Vorlage gelang. Die Hüllen wiesen mehr oder weniger die gleichen Formen und Größen wie ihre Template auf. Eine Aussicht, den diese Technik für die nahe Zukunft liefert, ist die Möglichkeit auf der Grundlage anderer biologischer Zellen, Polyelektrolytkapseln in geradezu unbegrenzter Formenvielfalt herzustellen. So zeigte



sich auch bei der Herstellung von Polyelektrolytkapseln auf der Grundlage von Erythrocyten, daß sich diese wesentlich komplexere Form auf die Kapseln übertragen läßt.

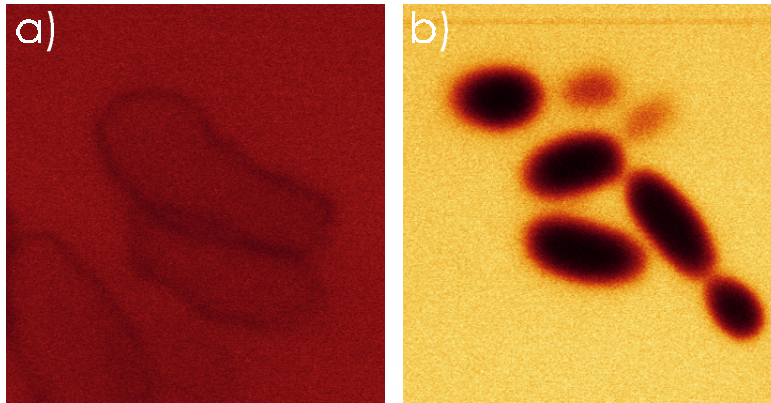


Bild 6.16: Konfokale Rasteraufnahmen von Polyelektrolytschalen (Erythrozyten als Templat) in 100  $\mu\text{M}$  6-CF Lösung: a) 10 Schichten ( $11,4 \mu\text{m} \times 11,4 \mu\text{m}$ ), b) 10 Schichten plus eine zusätzliche Schicht DPPA ( $18 \mu\text{m} \times 18 \mu\text{m}$ ).

Mögliche Anwendungen für diese Polyelektrolythüllen werden insbesondere in der Verwendung als Kapseln im Mikro- und Nanometerbereich in sowohl technologischen als pharmazeutischen Bereichen liegen. Eine Voraussetzung ist dabei die Permeabilität der Schalen zu kontrollieren. Durch die Polyelektrolytschichten können kleinere Moleküle ungehindert durchdringen, wie es bereits durch das Auflösen der Proteine beim Herstellungsprozeß zu erkennen war. Durch das Aufbringen von Lipiden auf die Außenseite der Erythrozytenhüllen ist es kürzlich gelungen, die Permeabilität drastisch zu reduzieren<sup>2</sup>. Im Bild 6.16 sind zwei konfokale mikroskopische Aufnahmen von Polyelektrolytschalen zu sehen. In beiden Fällen wurde als Fluoreszenzmarker 6-Carboxyfluorescein (6-CF) in die Lösungen gegeben. Im Bild 6.16a sind Polyelektrolytschalen zu sehen. Offensichtlich kann 6-CF ungehindert in das Innere der Schalen eindringen. Im Bild 6.16b wurde auf die Schalen zuvor eine Lipidschicht gebracht (hier: Dipalmitoylphosphatidsäure (DPPA)). Es ist deutlich zu erkennen das 6-CF nicht mehr in die Partikel eindringen kann. Es zeigte sich, daß selbst eine Inkubationszeit von 20h nicht ausreichte, um die innere 6-CF Konzentration an die

---

<sup>2</sup> Donath et al., bisher unveröffentlichte Resultate

äußere anzugleichen. Die Verbindung von Polyelektrolytschalen mit Lipidschichten ermöglicht es so die Permeabilität dieser Partikel zu kontrollieren.

Eine weitere interessante Anwendung stellt die gezielte Präzipitation von organischen und anorganischen Materialien in diesen Kapseln dar [1,80]. Im Bild 6.17 ist hierfür als Beispiel eine Polyelektrolytschale zu sehen, in der 6-CF auskristallisiert ist<sup>3</sup>. Im Bild 6.17a ist eine lichtmikroskopische Aufnahme der mit 6-CF gefüllten Hüllen zu sehen, die hier völlig lichtundurchlässig erscheinen. Bild 6.17b zeigt eine konfokale Aufnahme, in der die Fluoreszenz der 6-CF gefüllten Hülle deutlich zu erkennen ist. Es lassen sich also Materialien in diesen Kapseln präzipitieren, wobei die Form und Größe durch die der Kapseln vorgegeben sind. Somit ermöglichen die Hüllen die Herstellung von Kolloiden mit ausgezeichneten monodispersiven Eigenschaften in quasi beliebiger Formenvielfalt.

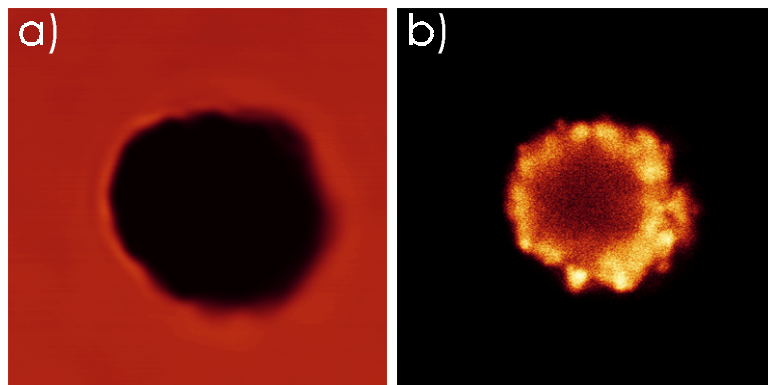


Bild 6.17: Mikroskopische Aufnahmen ( $12\ \mu\text{m} \times 12\ \mu\text{m}$ ) von Polyelektrolytschalen (Erythrozyten als Templat, 10 Schichten) in denen 6-CF präzipitiert wurde: a) Durchlichtaufnahme, b) konfokale Rasteraufnahme.

Neben diesen Gestaltungsmöglichkeiten, welche die Polyelektrolythüllen liefern, könnte auch das gezielte Aufbringen von Polyelektrolytschichten auf native Zellen eine interessante Möglichkeit im Bereich der Bioeinkapselung darstellen. Untersuchungen werden auch in diesem Feld nötig sein, um eventuell vorhandene Vorteile gegenüber anderen Methoden abzustecken. Die mechanische Stabilität und auch die Möglichkeit die Permeabilität der Polyelektrolytkapseln zu steuern, lassen auf ein enormes Potential

---

<sup>3</sup> Donath et al., bisher unveröffentlichte Resultate

hoffen. So könnten Polyelektrolytfilme auf Zellen diese gegen mechanische, chemische und auch biologische Bedrohung schützen.

## Literatur

- [1] Aksay, I.A., M. Trau, S. Manne, I. Honma, N. Yao, L. Zhou, P. Fenter, P.M. Eisenberger und S.M. Gruner. Biomimetic pathways for assembling inorganic thin films. *Science*, 273, 892-898, **1996**.
- [2] Arnold, W.M. und U. Zimmermann. Electrorotation: Development of a technique for dielectric measurements on individual cells and particles. *J. Electrostatics*, 21, 151-191, **1988**.
- [3] Arnold, W.M. und U. Zimmermann. Rotating-field-induced rotation and measurement of the membrane capacitance of single mesophyll cells of *avena sativa*. *Z. Naturforsch.*, 37c, 908-915, **1982**.
- [4] Arnold, W.M., H.P. Schwan und U. Zimmermann. Surface conductance and other properties of latex particles measured by electrorotation. *J. Phys. Chem.*, 91, 5093-5098, **1987**.
- [5] Asami, K. und T. Yamaguchi. Dielectric spectroscopy of plant protoplasts. *Biophys. J.*, 63, 1493-1499, **1992**.
- [6] Asami, K., Y. Takahashi und S. Takashima. Dielectric properties of mouse lymphocytes and erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1010, 49-55, **1989**.
- [7] Bäumler, H. und E. Donath. Does dextran indeed significantly increase the surface potential of human red blood cells? *Stud. Biophys.*, 120, 113-122, **1987**.
- [8] Bäumler, H. und W. Meier. Modifikation eines Ubbelohde-Kapillarviskosimeters nach Berger-Deckert zur Bestimmung der Plasmaviskosität. *Z. Klin. Med.*, 40, 1605-1606, **1985**.
- [9] Bäumler, H., B. Neu, S. Iovtchev, A. Budde, H. Kiesewetter, R. Latza und E. Donath. Electroosmotic and polymer depletion layers near surface conducting particles are detectable by low frequency electrorotation. *Coll. Surf. A*, in press, **1998**.

- [10] Bäuml, H., E. Donath, A. Krabi, W. Knippel, A. Budde und H. Kieseewetter. Electrophoresis of human red blood cells and platelets. Evidence for Depletion of dextran. *Biorheology*, 33, 333-351, **1996**.
- [11] Bäuml, H., E. Donath, L. Pratsch und D. Lerche. Aggregation and disaggregation of human red blood cells in neutral polymer solutions. *Hémorhéologie et aggrégation érythrocytaire (3)*, Eds. J.F. Stoltz, M. Donner, A.L. Copley, Ed. Médicale Int., Cachan, 24-37, **1991**.
- [12] Bäuml, H., I. Djenev, S. Iovtchev, R. Petrova, und D. Lerche. Polarizability of human red blood cells and conformational state of glycocalyx. *Stud. Biophys.*, 125, 45-51, **1988**.
- [13] Böhmer, M.R., O.A. Evers und J.M.H.M. Scheutjens. Weak polyelectrolytes between two surfaces: adsorption and stabilisation. *Macromolecules*, 23, 2288-2301, **1990**.
- [14] Brooks, D.E. und G.V.F. Seaman. The effect of neutral polymers on the electrokinetic potential of cells and other charged particles. *J. Colloid Interface Sci.*, 43, 670-686, **1973**.
- [15] Brooks, D.E.. The effect of neutral polymers on the elektrokinetic potential of cells and other charged particles (II). *J. Colloid Interface Sci.*, 43, 687-699, **1973**.
- [16] Burt, J.P.H., K.L. Chan, D. Dawson, A. Patron und R. Pethig. Assays for microbial contamination and DNA analysis based on electrorotation. *Ann. Biol. Clin.*, 54, 253-257, **1996**.
- [17] Caruso, F. , D.G. Kurth, D. Volkmer, M.J. Koop und A. Müller. Ultrathin molybdenum polyoxometalate – polyelectrolyte multilayer films. *Langmuir*, 14, 3462-3465, **1998**.
- [18] Caruso, F., E. Donath und H. Möhwald. Influence of polyelektrolyte multilayer coatings on Förster resonance energy transfer between 6-carboxyfluorescein and rhodamin B-labeled particles in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B*, 102, 2011-2016, **1998**.

- 
- [19] Caruso, F., E. Rodda, D.N. Furlong, K. Niikura und Y. Okahata. Quartz crystal microbalance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic acid sensor development. *Anal. Chem.*, 11, 2043-2049, **1997**.
- [20] Caruso, F., K. Niikura, D.N. Furlong und Y. Okahata. 2. assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing. *Langmuir*, 13, 3427-3433, **1997**.
- [21] Cowell, C., F.K. Li-in-on und B. Vincent. Reversible flocculation of sterically-stabilized dispersions. *J. Chem. Soc., Faraday Tran.*, 74, 337-347, **1978**.
- [22] Decher, G., B. Lehr, K. Lowack, Y. Lvov und J. Schmitt. New nanocomposite films for biosensors: layer-by-layer adsorbed films of polyelektrolytes, proteins or DNA. *Biosens. Bioelectron.*, 9, 677-684, **1994**.
- [23] Decher, G.. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicompo-sites. *Science*, 277, 1232-1237, **1997**.
- [24] DeLacey, E.H.B. und L.R. White. Dielectric response and conductivity of dilute suspensions of colloidal particles. *J. Chem. Soc., Faraday Tran. 2*, 77, 2007-2039. **1981**.
- [25] Dobos, D. Electrochemical data. Akademiai kiado, Budapest. **1975**.
- [26] Donath E. und A. Voigt. Electrophoretic mobility of human erythrocytes. On the applicability of the charged layer model. *Biophys. J.*, 49, 493-499, **1986**.
- [27] Donath, E., A. Budde, E. Knippel und H. Bäumler. „Hairy surface layer“ concept of electrophoresis combined with local fixed surface charge density isotherms: Application to human erythrocyte electrophoretic fingerprinting. *Langmuir*, 12, 4832-4839, **1996**.
- [28] Donath, E., A. Krabi, G. Allan und B. Vincent. A study of polymer depletion layers by electrophoresis: The influence of viscosity profiles and the nonlinearity of the Poisson-Boltzmann equation. *Langmuir*, 12, 3425-3430, **1996**.

- [29] Donath, E., D. Walther, V.N. Shilov, E. Knippel, A. Budde, K. Lowack, C.A. Helm und H. Möhwald. Nonlinear hairy layer theory of electrophoretic fingerprinting applied to consecutive layer by layer polyelectrolyte adsorption onto charged polystyrene latex particles. *Langmuir*, 13, 5294-5305, **1997**.
- [30] Donath, E., G.B. Sukhorukov, F. Caruso, S.A. Davis und H. Möhwald. Novel hollow polymer shells via colloid templated assembly of polyelektrolytes. *Angew. Chem.*, 110, 2323-2327, **1998**.
- [31] Donath, E., L. Pratsch, H. Bäuml, A. Voigt und M. Taeger. Macromolecule depletion at membranes. *Stud. Biophys.*, 130, 117- 122, **1989**.
- [32] Donath, E., M. Egger und V.P. Pastushenko. Electrorotation behaviour of aggregated particles. A theoretical study. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 31, 115-129, **1993**.
- [33] Donath, E., P. Kuzmin, A. Krabi und A. Voigt. Elektrokinetics of structured interfaces with polymer depletion – a theoretical study. *Colloid Polymer Sci.*, 271, 930-939, **1993**.
- [34] Donath, E., V. Pastushenko und M. Egger. Dielectric behavior of the anion-exchange protein of human red blood cells: Theoretical analysis and comparison to electrorotation data. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 23, 337-360, **1990**.
- [35] Donlon, J.A. und A. Rothstein. The Cation permeability of erythrocytes in low ionic strength media of various tonicities. *J. Membrane Biol.*, 1, 37-52, **1969**.
- [36] Dukhin, S.S., and V. N. Shilov. Dielectric phenomena and the double layer in disperse systems and polyelectrolytes. Wiley, New York, **1974**.
- [37] Egger, M., and E. Donath. Electrorotation measurements of diamide-induced platelet activation changes. *Biophys. J.*, 68, 364-372, **1995**.
- [38] Egger, M., E. Donath, P. Kuzmin und V.P. Pastushenko. Electrorotation of dumb-bell shaped particles. Theory and experiment. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 26, 383-393, **1991**.

- 
- [39] Egger, M., E. Donath, S. Ziemer und R. Glaser. Electrorotation – a new method for investigating membrane events during thrombocyte activation. Influence of drugs and osmotic pressure. *Biochim. Biophys. acta*, 861, 122-130, **1986**.
- [40] Eylar, E.H., M.A. Madoff, O.V. Brody und J.L. Oncley. The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, 237, 1992-2000, **1962**.
- [41] Fahreus, R.. The suspension stability of the blood. *Physiol. Rev.*, 9, 241-275, **1929**.
- [42] Feigin, R.I. und D.H. Napper. Depletion stabilization and depletion flocculation. *J. Colloid Interface Sci.*, 75, 525-541, **1980**.
- [43] Fendler, J. H.. Self-assembled nanostructured materials. *Chem. Mat.*, 8, 1616-1624, **1996**.
- [44] Fixman, M.. Thin double layer approximation for electrophoresis and dielectric response. *J. Chem. Phys.*, 78, 1483-1491, **1983**.
- [45] Fleer, G.J., J.M.H.M. Scheutjens und M.A. Cohen Stuart. Theoretical progress in polymer adsorption, steric stabilization and flocculation. *Colloids Surf.*, 31, 1-29, **1988**.
- [46] Fleer, G.J., J.M.H.M. Scheutjens, M.A. Cohen Stuart, T. Cosgrove und B. Vincent. Polymers at Interfaces. *Chapmann & Hall*, London, **1993**.
- [47] Foster, K.R., F.A. Sauer und H.P. Schwan. Electrorotation and levitation of cells and colloidal particles. *Biophys. J.*, 63, 180-190, **1992**.
- [48] Fuhr, G. und P.I. Kuzmin. Behavior of cells in rotating electric fields with account to surface charges and cell structures. *Biophys. J.*, 50, 789-795, **1986**.
- [49] Fuhr, G., P. Roesch, T. Müller, V. Dressler und H. Göring. Dielectric spectroscopy of chloroplasts isolated from higher plants – characterization of the double-membrane system. *Plant Cell Physiol.*, 31, 975-985, **1990**.



- [50] Fuhr, G., U. Zimmermann und S.G. Shirley. Cell motion in time-varying fields: principles and potential. *Electromanipulation of Cells*, U. Zimmermann und G. A. Neil, Eds., CRC Press, Boca Raton, 259-328, **1996**.
- [51] Fuhr, G.. Über die Rotation dielektrischer Körper in rotierenden Feldern. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, **1985**.
- [52] Georgieva, R., B. Neu, V.M. Shilov, E. Knippel, A. Budde, R. Latza, E. Donath, H. Kieseewetter und H. Bäumler. Low Frequency Electrorotation of Fixed Red Blood Cells. *Biophys. J.*, 74, 2114-2120, **1998**.
- [53] Georgieva, R., E. Donath und R. Glaser. On the determination of human erythrocyte intracellular conductivity by means of electrorotation – influence of osmotic pressure. *Stud. Biophys.*, 133, 185-197, **1989**.
- [54] Gimsa, J., P. Marszalek, U. Loewe und T.Y. Tsong. Dielectrophoresis and electrorotation of neurospora slime and murine myeloma cells. *Biophys.J.*, 60, 749-760. **1991**.
- [55] Gimsa, J., R. Glaser und G. Fuhr. 1991. Physical Characterisation of Biological Cells. Verlag Gesundheit GmbH, Berlin. W. Schütt, H. Klinkmann, I. Lamprecht und T. Wilson, 295-323, **1991**.
- [56] Gimsa, J., T. Müller, T. Schnelle und G. Fuhr. Dielectric spectroscopy of single human erythrocytes at physiological ionic strengths: dispersion of the cytoplasm. *Biophys. J.*, 71, 498-506, **1996**.
- [57] Gimsa, J., T. Schnelle, G. Zechel und R. Glaser. Dielectric spectroscopy of human erythrocytes: investigations under the influence of nystatin. *Biophys. J.*, 66, 1244-1253, **1994**.
- [58] Grosse, C. und V.N. Shilov. Theory of the low-frequency electrorotation of polystyrene particles in electrolyte solution. *J. Phys. Chem.*, 100, 1771-1778, **1996**.
- [59] Grümmer, G., E. Knippel, A. Budde, H. Brockmann und J. Treichler. An electrophoretic instrumentation for the multi-parameter analysis of cells and particles. *Instr. Sci. Techn.*, 23, 265-276, **1996**.

- 
- [60] Heard, D.H. und G.V.F. Seaman. The action of lower aldehydes on the human erythrocyte. *Biochim. Biophys. Acta*, 53, 366-374, **1961**.
- [61] Hu, X., W.M. Arnold und U. Zimmermann. Alterations in the electrical properties of T and B lymphocyte membranes induced by mitogenic stimulation. Activation monitored by electro-rotation of single cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1021, 191-200, **1990**.
- [62] Huang, Y., X.B. Wang, R. Hölzel, F.F. Becker und P.R. Gascoyne. Eletrorotational studies of the cytoplasmatic dielectric properties of friend murine erythroleukaemia cells. *Phys. Med. Biol.*, 40 (11), 1789-1806. **1995**.
- [63] Jones, T.B.. Electromechanics of particles. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, **1995**.
- [64] Keller, S.W., S.A. Johnson, E.S. Brigham, E.H. Yonemoto und T.E. Mallouk. Photoinduced charge separation in multilayer thin films grown by sequential adsorption of polyelektrolytes. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 12879-12880, **1995**.
- [65] Kellog, G.J., A.M. Mayes, W.B. Stockton, M. Ferreira, M.F. Rubner und S.K. Satija. Neutron reflectivity investigations of self-assembled conjugated polyion multilayers. *Langmuir*, 12, 5109-5113, **1996**.
- [66] Kijlstra, J., H.P. van Leeuwen und J. Lyklema. Effect of surface conduction on the elctrokinetic properties of colloids. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 88, 3441-3449, **1992**.
- [67] Kijlstra, J., H.P. van Leeuwen und J. Lyklema. Low-frequency dielectric relaxation of hematite and silica sols. *Langmuir*, 9, 1625-1633, **1993**.
- [68] Kijlstra, J.. Double layer relaxation in colloids. Thesis. Agricultural University Wageningen, **1992**.
- [69] Klitzing, R.v. und H. Möhwald. A realistic diffusion model for ultrathin polyelectrolyte films. *Macromolecules*, 29, 6901-6906, **1996**.
- [70] Klitzing, R.v. und H. Möhwald. Proton concentration profile in ultrathin polyelectrolyte films. *Langmuir*, 11, 3554-3559, **1995**.

- [71] Korneev, D., Y. Lvov, G. Decher, J. Schmitt und S. Yaradaikin. Neutron reflectivity analysis of self-assembled film superlattices with alternate layers of deuterated and hydrogenated polystyrenesulfonate and polyallylamine. *Physica B*, 213-214, 954-956, **1995**.
- [72] Krabi, A. und E. Donath. Polymer depletion layers as measured by electrophoresis. *Coll. Surf. A*, 92, 175-182, **1994**.
- [73] Lasic, D.D.. *Liposomes: From Physics to Applications*. Elsevier, Amsterdam, **1993**.
- [74] Laurent, D. und J. B. Schlenoff. Multilayer assemblies of redox polyelectrolytes. *Langmuir*, 13, 1552-1557, **1997**.
- [75] Lewis, D.D. *Biodegradable Polymers and Drug Delivery Systems*. M. Chasin and R. Langer, Eds., Marcel Dekker, New York, **1990**.
- [76] Lowack, K. und C. Helm. Molecular mechanisms controlling the self-assembly process of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules*, 31, 823-833, **1998**.
- [77] Luner, J.L., P. Sturgeon, D. Szklarek und D.T. McQuiston. Effects of proteases and neuraminidase on RBC surface charge and agglutination. *Vox. Sang.*, 28, 184-199, **1975**.
- [78] Lvov, Y., K. Ariga und T. Kunitake. Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 6117-6123, **1995**.
- [79] Maier, H.. Electrorotation of colloidal particles and cells depends on surface charge. *Biophys. J.*, 73, 1617-1626, **1997**.
- [80] Mann, S.. Molecular recognition in biomineralization. *Nature*, 332, 119-124, **1988**.
- [81] Marchesi, V.T., H. Furthmayr und M. Tomita. The red cell membrane. *Annual Rev. Biochem.*, 45, 667-698, **1976**.

- 
- [82] Müller, T., L. Küchler, G. Fuhr, T. Schnelle und A. Sokirko. Dielektrische Einzelzellspektroskopie an Pollen verschiedener Waldbaumarten – Charakterisierung der Pollenvitalität. *Silvae Genet.*, 42, 311-322, **1993**.
- [83] Napper, D.H. Polymeric stabilisation of colloidal dispersions. Academic Press: New York/London, **1983**.
- [84] Neu, B., R. Georgieva, H. Bäuml, V.M. Shilov, E. Knippel und E. Donath. Low Frequency dispersion of surface conducting particles as measured by means of electrorotation. *Coll. Surf. A*, 140, 325-332, **1998**.
- [85] Oshima, H.. Electrophoresis of soft particles. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 62, 189-235, **1995**.
- [86] Pastushenko, V.Ph., P.I. Kuzmin und Y.A. Chizmadzhev. Dielectrophoresis and electrorotation: a unified theory of spherically symmetrical cells. *Stud. Biophys.*, 110, 51-57, **1985**.
- [87] Paul, R., K.V.I.S. Kaler, and T.B. Jones. A nonequilibrium statistical mechanical calculation of the surface conductance of the electrical double layer of biological cells and its application to dielectrophoresis. *J. Phys. Chem.*, 97, 4745-4755, **1993**.
- [88] Pauly, H., and H. P. Schwan. Dielectric properties and ion mobility in erythrocytes. *Biophys. J.*, 6, 621-639, **1966**.
- [89] Pratsch, L. und E. Donath. Poly-(ethylene glycol) depletion layers on human red blood cell surface measured by electrophoresis. *Stud. Biophys.*, 123, 101- 108, **1988**.
- [90] Prüger, B., P. Eppmann, E. Donath und J. Gimsa. Measurement of inherent particle properties by dynamic light scattering: introducing electrorotational light scattering. *Biophys. J.*, 72, 1414-1424, **1997**.
- [91] Schmitt J., G. Decher, W.J. Dressick, S.L. Brandow, R.E. Geer, R. Shashidhar und J.M. Calvert. Metal nanoparticle/polymer superlattice films: fabrication and control of layer structure. *Advanced Materials*, 9, 61-65, **1997**.

- [92] Schmitt, J.T., T. Grünwald, G. Decher, P.S. Pershan, K. Kjaer und M. Lösche. Internal structure of layer-by-layer adsorbed polyelektrolyte films: a neutron and x-ray reflectivity study. *Macromolecules*, 26, 7058-7063, **1993**.
- [93] Sharp, K.A. und D.E. Brooks. Calculation of the electrophoretic mobility of a particle bearing bound polyelectrolyte using the nonlinear Poisson-Boltzmann equation. *Biophys. J.*, 47, 563-566, **1985**.
- [94] Shilov, V.N. und S.S. Dukhin. The theory of low frequency dielectric permeability of suspensions of spherical colloidal particles caused by double layer polarization. *Kolloidn. Zh.* 32, 117-123, **1970**.
- [95] Shilov, V.N. und S.S. Dukhin. The theory of polarization of diffuse part of thin double layer of spherical particles in alternating fields. *Kolloidn. Zh.*, 32, 293-300, **1970**.
- [96] Snabre, P., G.H. Grossmann und P. Mills. Effects of dextran polaydispersity on red blood cell aggregation. *Colloid Polymer Sci.*, 263, 478-483, **1985**.
- [97] Starov, V.M. und N.V. Churayev. Effect of elevated viscosity of water boundary layers on elektrokinetic phenomena in capillaries. *Kolloidn. Zh.*, XLI, 297-300, **1979**.
- [98] Sukhorukov, G.B., E. Donath, S. Davis, H. Lichtenfeld, F. Caruso, V.I. Popov, und H. Möhwald. Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: a novel approach to colloid design. *Polym. Adv. Technol.*, 9, 759-767, **1998**.
- [99] Sukhorukov, G.B., E. Donath, H. Lichtenfeld, E. Knippel, M.Knippel, A. Budde und H. Möhwald. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids Surf., A*, 137, 253-266, **1998**.
- [100] Sukhorukov, G.B., H. Möhwald, G. Decher und Y.M. Lvov. Assembly of polyelectrolyte multilayer films by consecutively alternating adsorption of polynucleotides and polycations. *Thin Solid Films*, 284-285, 220-223, **1996**.

- 
- [101] Sukhorukov, G.B., M.M. Montrel, A.I. Petrov, L.I. Shabarchina und B.I. Sukhorukov. Multilayer films containing immobilized nucleic acids. Their structure and possibilities in biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.*, 11, 913-922, **1996**.
- [102] Sukhorukov, V.L. und U. Zimmermann. Electrorotation of erythrocytes treated with dipicrylamine: mobile charges within the membrane show their „signature“ in rotational spectra. *J. Membr. Biol.*, 153, 161-169, **1996**.
- [103] Vincent, B., J. Edwards, S. Emmett und A. Jones. Depletion flocculation in dispersions of sterically-stabilised particles (“soft spheres“). *Colloids Surf.*, 18, 261-281, **1986**.
- [104] Vincent, B., J. Edwards, S. Emmett und R. Croot. Phase separation in dispersions of weakly-interacting particles in solutions of nonadsorbing polymer. *Colloids Surf.*, 31, 267-298, **1988**.
- [105] Wang, X.-B., Y. Huang, P.R.C. Gascoyne, F.F. Becker, R. Hölzel und R. Pethig. Changes in Friend murine erythroleukaemia cell membranes during induced differentiation determined by electrorotation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1193, 330-344, **1994**.
- [106] Wang, X.-B., Y. Huang, R. Hölzel, J.P.H. Burt und R. Pettig. Theoretical and experimental investigations of the interdependence of the dielectric, dielectrophoretic and electrorotational behaviour of colloidal particles. *J. Phys. D:Appl. Phys.*, 26, 312-322, **1993**.
- [107] Wicher, D. und J. Gündel. Electrorotation of multi- and oligolamellar liposomes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 21, 279-288, **1989**.
- [108] Wicher, D., J. Gündel und H. Matthies. Electrorotation of liposomes in the  $\alpha$  - and  $\beta$  - dispersion range. *Stud. Biophys.*, 119, 103-104, **1987**.
- [109] Wicher, D., J. Gündel und H. Matthies. Measuring chamber with Extended Applications of the electrorotation.  $\alpha$  - and  $\beta$  - dispersion of liposomes. *Stud. Biophys.*, 115, 51-58, **1986**.

- [110] Zhou, X.-F., G.H. Marx, R. Pethig, und I.M. Eastwood. Differentiation of viable and non-viable bacterial biofilms using electrorotation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1245, 85-93, **1995**.

## Abkürzungen und Symbole

6-CF	6-Carboxyfluorescein
$a$	Zell-/Partikelradius
AFM	Atomkraftmikroskop ( <i>atomic force microscope</i> )
CSLM	konfokales Raster Laser Mikroskop ( <i>confocal scanning laser microscopy</i> )
CSM	kubisch strukturiertes Modell ( <i>cubically structured model</i> )
$d$	Abstand der Vesikel (CSM)
DPPA	Dipalmitoylphosphatidsäure
$E$	elektrische Feldstärke
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
$e_o$	Elementarladung
$f$	Frequenz des rotierenden elektrischen Feldes
$f_{0l}$	Feldfrequenz bei der die parallele Partikelrotation in die antiparallele übergeht (d.h. keine Partikelrotation)
FA	Formaldehyd
$f_{c1}$	Feldfrequenz maximaler antiparalleler Partikelrotation im $\beta$ -Dispersionsgebiet
$f_{c2}$	Feldfrequenz maximaler paralleler Partikelrotation im $\beta$ -Dispersionsgebiet
$f_{cL}$	Feldfrequenz maximaler Partikelrotation im $\alpha$ -Dispersionsgebiet
FITC	Flouresceinisothiocyanat
GA	Glutaraldehyd
$G_e$	Externe Leitfähigkeit
$G_{ef}$	Effektive innere Leitfähigkeit (CSM)
$G_g$	Leitfähigkeit im Vesikelzwischenraum (CSM)
$G_i$	Innenleitfähigkeit (SSM)
$G_{in}^v$	Innenleitfähigkeit der Innenvesikel (CSM)
$G_m$	Membranleitfähigkeit
$G_m^v$	Membranleitfähigkeit der Innenvesikel (CSM)
$h$	Membrandicke
$k$	Boltzmann-Konstante
$L$	Kantenlänge der Vesikel (CSM)
$l_D$	Debye-Länge



mPAH	FITC markiertes PAH
$N$	Drehmoment
$N_L$	Loschmidt-Konstante
$N_R$	Reibungsdrehmoment
$p$	Dipolmoment
PAH	Poly(allylamine)hydrochlorid
PSS	Poly(styrensulfonat)natriumsalz
SEM	Rasterelektronenmikroskop ( <i>scanning electron microscope</i> )
SSM	Einschalen Modell ( <i>single shell model</i> )
$T$	Temperatur
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
$\chi$	Kehrwert der Debye-Länge
$\epsilon_e$	Externe Dielektrizitätskonstante
$\epsilon_{ef}$	Effektive innere frequenzabhängige Dielektrizitätskonstante (CSM)
$\epsilon_i$	Innere Dielektrizitätskonstante (SSM)
$\epsilon_{in}^v$	Dielektrizitätskonstante der Innenvesikel (CSM)
$\epsilon_m$	Dielektrizitätskonstante der Membran (SSM)
$\epsilon_m^v$	Dielektrizitätskonstante der Membran der Innenvesikel (CSM)
$\epsilon_0$	elektrische Feldkonstante
$\eta$	Viskosität
$\eta_0$	Viskosität an Partikeloberfläche
$\eta_p$	Viskosität in Polymerlösung
$\eta_s$	Viskosität in Salzlösung (bzw. Kontrollösung)
$\lambda$	Depletionschichtdicken-Parameter
$\mu$	elektrophoretische Mobilität
$\mu_{Dx}$	elektrophoretische Mobilität in Dextranlösung
$\mu_s$	elektrophoretische Mobilität in Kontrollösung
$\sigma$	Oberflächenladungsdichte
$\omega$	Kreisfrequenz des rotierenden elektrischen Feldes
$\omega_p$	Kreisfrequenz der Partikel-/Zellrotation

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich noch bei denen Bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei PD Dr. H. Bäumler (Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Charité, Berlin) für die Ermöglichung und Unterstützung dieser Arbeit und PD Dr. E. Donath (Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Berlin) für die fruchtbare Zusammenarbeit mit ihren zahlreichen Diskussionen.

Weiterhin gebührt noch Prof. Dr. G. Fuhr (Institut für Biologie der HU-Berlin) für die Betreuung und Unterstützung Dank, sowie Prof. Dr. V.N. Shilov (Institute of Biocolloid Chemistry, Kiev, Ukraine), Dr. R. Georgieva (Thrakia University, Stara Zagora, Bulgarien), S. Jovtchev (Medical Academy, Sofia, Bulgarien), Dr. T. Müller (Institut für Biologie der HU-Berlin), Dr. J. Gimsa (Institut für Biologie der HU-Berlin) und B. Prüger (Institut für Biologie der HU-Berlin) für ihre Kooperation, Ch. Dürr (Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Berlin) für die AFM-Aufnahmen, P. Klein und C. Reichle (Institut für Biologie der HU-Berlin) für die konfokalen Rasteraufnahmen, J. Hartmann und R. Pitschke (Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Berlin) für die SEM-Aufnahmen, G. Holland (Institut für Anatomie der Charité, Berlin) für die TEM-Messungen und der Deutschen Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung.

## **Lebenslauf**

Björn Neu

- geboren am 09.06.1969 in Eutin
- 1975-1979 Besuch der Grundschule Ostrohe (Schleswig Holstein)
- 1979-1988 Besuch des Gymnasium Heide Ost (Schleswig Holstein) mit Abschluß Abitur
- 1988-1989 Wehrdienst in Heide (Schleswig Holstein)
- Oktober '89 Beginn des Physikstudiums an der Freien Universität Berlin
- Sommersemester '92 Auslandsaufenthalt in Australien
- April '94-Aug.'95: Einsemestriges Laborpraktikum und im Anschluß Diplomarbeit am Institut für Experimentalphysik der FU-Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rieder mit dem Thema: Untersuchungen zur CO-Adsorption auf der Cu(211)-Oberfläche und Manipulation von Atomen und Molekülen mit einem Tieftemperatur-Rastertunnelmikroskop.
- Oktober '95 Abschlußprüfung zum Diplom-Physiker.
- seit März '96 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Charité in Berlin.

### **Wissenschaftliche Publikationen**

*Low frequency dispersion of surface conducting particles as measured by means of electroration*

Neu, B., R. Georgieva, H. Bäuml, V.M. Shilov, E. Knippel und E. Donath  
Coll. and Surf. A, 140, 325-332, **1998**.

*Low frequency electroration of fixed red blood cells*

R. Georgieva, Neu, B., V.M. Shilov, E. Knippel, A. Budde, R. Latza, E. Donath, H. Kieseewetter und H. Bäuml  
Biophys. J., 74, 2114-2120, **1998**.

*Electroosmosis and polymer depletion layers near surface conducting particles are detectable by low frequency electroration*

H. Bäuml, Neu, B., S. Iovtchev, A. Budde, H. Kieseewetter, R. Latza und E. Donath  
Coll. and Surf. A, im Druck, **1998**.

*Controlled lateral manipulation of single molecules with the scanning tunneling microscope*

G. Meyer, B. Neu und K.H. Rieder  
Appl. Phys. A, 60, 343-345, **1995**.

*Schreiben mit Molekülen*

G. Meyer, B. Neu und K.H. Rieder  
Physikal. Bl., 26, Titelseite u. 105-106, **1995**.

*Nanostructures from molecules*

G. Meyer, B. Neu und K.H. Rieder  
Europhys. News, 26, 7-8, **1995**.

*Identification of ordered CO structures on Cu(211) using low temperature scanning tunneling microscopy*

G. Meyer, B. Neu und K.H. Rieder  
Chem. Phys. Lett., 240, 379-384, **1995**.

*Controlled vertical and lateral manipulation of single atoms and molecules with the scanning tunneling microscope*

B. Neu, G. Meyer und K.H. Rieder  
Mod. Phys. Lett. B, 15, 963-968, **1995**.

*Building nanostructures by controlled manipulation of single molecules with the scanning tunneling microscope*

G. Meyer, B. Neu und K.H. Rieder  
Phys. stat. sol., 192, 313-324, **1995**.

*Vertical manipulation of single atoms*

G. Meyer, B. Neu und K.H. Rieder  
Europhys. News, 27, 16, **1996**.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, d.20.12.99

Björn Neu